



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

VIRGÍNIA DE MENESES PEREIRA GURGEL

AVALIAÇÃO RETINIANA EM ADULTOS COM
DEFICIÊNCIA ISOLADA, CONGÊNITA E VITALÍCIA
DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

ARACAJU

2016

VIRGÍNIA DE MENESES PEREIRA GURGEL

**AVALIAÇÃO RETINIANA EM ADULTOS COM
DEFICIÊNCIA ISOLADA, CONGÊNITA E VITALÍCIA
DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira.

ARACAJU

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

VIRGÍNIA DE MENESES PEREIRA GURGEL

AVALIAÇÃO RETINIANA EM ADULTOS COM
DEFICIÊNCIA ISOLADA, CONGÊNITA E VITALÍCIA
DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Sergipe.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira

1º Examinador: Prof. Dr. Cesar Luiz Boguszewski

2º Examinador: Prof. Dr. Gustavo Barreto de Melo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Renato e Zerinha, que com amor e cuidado nunca se distanciaram do firme propósito de proporcionar a suas filhas voos mais altos que aqueles por eles alcançados.

Ao meu esposo Roberto e a meus filhos Thaís, Roberto e Sylvia pela compreensão, carinho e apoio emocional, indispensáveis à realização de semelhante tarefa.

À minha irmã Sílvia e seu esposo Renato por todo o apoio familiar e técnico, me permitindo total dedicação a este projeto e contribuindo para o aperfeiçoamento de sua apresentação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manuel Hermínio, pela generosidade em dividir seus múltiplos conhecimentos e, sobretudo, por sua amizade.

Ao Dr. Roberto Salvatori, pela sua inestimável colaboração.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pelo apoio e incentivo, especialmente à Prof.^a Dra. Rosana Cipolotti, pela valiosa contribuição.

Ao Prof. Dr. Gustavo Barreto de Melo, por sua colaboração inestimável.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Pereira, por sua valiosa contribuição.

À Dra. Ann Hellström por sua inestimável parceria.

Ao Prof. Dr. Cesar Luiz Boguszewski, por atender ao convite se dispondo a colaborar com nosso trabalho.

À Dra. Viviane Correia, por sua preciosa colaboração.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela atenção, gentileza e disponibilidade às nossas demandas.

À equipe do Hospital Ocular, pelo acolhimento carinhoso e constante disposição em contribuir para a melhor execução deste trabalho.

A todos os participantes da pesquisa, pela esforço e disponibilidade, necessários ao avanço do conhecimento científico.

RESUMO

Contexto e Objetivo: O hormônio do crescimento (GH) tem importante papel no desenvolvimento da retina, como demonstram diversos modelos experimentais. Contudo, a relação entre o eixo GH/IGF-I e a neuro-vascularização da retina humana ainda não é completamente conhecida. O modelo da deficiência isolada, congênita e vitalícia do GH (DIGH) não tratada é ideal para estudar a ação do GH nos tecidos oculares. O objetivo deste trabalho é avaliar a neuro-vascularização retiniana em indivíduos adultos com DIGH.

Casuística e Métodos: Neste estudo transversal, examinamos 25 indivíduos (13 homens, idade 50,9 anos [12,0]) com DIGH devido a mutação c.57+1G>A no gene do receptor do hormônio liberador do GH e 28 controles (14 homens, idade 46,4 anos [14,7]), pareados por idade e sexo. Ambos os grupos foram submetidos a retinografia (para avaliar o número de ramificações nos vasos retinianos, o tamanho do disco óptico e da escavação) e tomografia de coerência óptica (OCT) (para avaliar a espessura da mácula).

Resultados: Os indivíduos com DIGH apresentaram maior redução no número de ramificações vasculares em relação aos controles (91% vs. 53% [p=0,049]), segundo teste exato de Fisher. A porcentagem de redução moderada foi maior na DIGH que nos controles (p=0,01). A taxa de indivíduos com aumento do disco óptico e da escavação foi maior na DIGH em relação aos controles (92,9% vs. 57,1% para o disco e 92,9% vs. 66,7% para a escavação [p<0,0001 em ambos os casos]). A porcentagem de aumento do disco óptico e da escavação foi maior na DIGH (p=0,005 e p=0,028, respectivamente). Não houve diferença na espessura da mácula.

Conclusões: A DIGH congênita e vitalícia não tratada provoca diminuição no número de ramificações dos vasos da retina, aumento do disco óptico e da escavação, mas não altera a espessura da mácula.

Palavras-chave: GH, IGF-I, Deficiência isolada de GH, Retina

ABSTRACT

Context and objective: Experimental models demonstrate an important role of growth hormone (GH) in retinal development. However, the interactions between GH/IGF-I axis and the neuro-vascularization of the human retina are still not clear. A model of untreated congenital isolated GH deficiency (IGHD) may clarify the action of GH on the retina. The purpose of this work was to assess the retinal neuro-vascularization in adults with congenital IGHD.

Methods: In a cross sectional study, we performed fundus photographs (to assess the number of retinal vascular branching points and the optic disc and cup size), and optical coherence tomography (to assess the thickness of macula) in 25 adults IGHD subjects (13 males, 50,9 yr. [12,0]) homozygous for a *null* mutation (c.57+1 G>A) in the GH releasing hormone receptor gene and 28 controls (14 males, 46,4 yr. [14,7]).

Results: Fisher's exact test revealed that IGHD subjects presented more reduction of vascular branching points in comparison to controls (91% vs. 53% [p=0.049]). Conversely, the percentage of moderate reduction in IGHD was higher than in control (p=0,01). The rates of individuals with increased optic disc and cup size were increased in IGHD in comparison to controls (92,9% vs. 57,1 for optic disc and 92,9% vs. 66,7% for cup [p<0.0001 in both cases]). The percentage of increased optic disc and cup in IGHD was higher than in control (p=0,005 for optic disc and p=0,028 for cup). There was no difference in fovea thickness or in any of the macula areas.

Conclusions: Most IGHD individuals present moderate reduction of vascular branching points, increase of optic disc and cup size, but equal thickness of the macula.

Key Words: Isolated GH deficiency, GH, IGF-I, Retina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mutação homozigótica no sítio de <i>splicing</i> do íntron 1 do gene do receptor do GHRH, Guanina → Adenina (c.57+1G>A), na DIGH de Itabaianinha. WT – não mutado; MUT – mutado	18
Figura 2. Anões de Itabaianinha com a equipe de pesquisa. Foto ilustra a baixa estatura proporcionada	19
Figura 3. Diagrama ilustrando as camadas que compõem o bulbo ocular humano	22
Figura 4. Diagrama ilustrando as camadas da retina	23
Figura 5. Fotomicrografia de retina humana.	24
Figura 6. Fundo de olho normal de indivíduo do grupo controle (retinografia do olho direito), destacando-se as estruturas analisadas neste trabalho	28
Figura 7. Nervo óptico normal em maior detalhe. Imagem obtida por retinografia de indivíduo do grupo controle, mostrando o disco óptico, a escavação, a rima (anel de fibras nervosas) e os vasos retinianos.....	29
Figura 8. Resultado normal de OCT (Stratus 3000) de indivíduo do grupo DIGH	31
Figura 9. Redução dos pontos de ramificação vascular na DIGH e controles em porcentagem	40
Figura 10. Porcentagem de aumento do disco óptico em indivíduos com DIGH e controles	41
Figura 11. Porcentagem de aumento da escavação em indivíduos com DIGH e controles.....	42
Figura 12. Comparação entre o fundo de olho de indivíduo com DIGH e controle em relação ao disco óptico, escavação e vascularização retiniana	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Redução dos pontos de ramificação dos vasos da retina em 11 DIGH e 17 controles, em números absolutos e porcentagem	37
Tabela 2. Tamanho do disco óptico e da escavação em indivíduos com DIGH e controles em números absolutos e porcentagem	38
Tabela 3. Dados da tomografia de coerência óptica (OCT) da mácula em 25 DIGH e 22 controles, em micrômetros	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALS – Subunidade proteica ácido lábil (*Acid-labile subunit*)
- CGR – Células ganglionares da retina
- DGH – Deficiência de GH
- GH – Hormônio do crescimento (*Growth hormone*)
- GHBP – Proteína ligadora do GH (*GH binding protein*)
- GHR – Receptor do hormônio do crescimento (*GH receptor*)
- GHRH – Hormônio liberador do hormônio do crescimento (*GH releasing hormone*)
- GHRHR – Receptor do GHRH (*GHRH receptor*)
- GHSR – Receptor específico para secretagogos do GH (*GH secretagogue receptor*)
- IGF – Fator de crescimento insulina-símile (*Insulin like growth fator*)
- IGFBP- Proteína ligadora do IGF (*IGF binding protein*)
- mRNA – RNA mensageiro
- OCT – Tomografia de coerência óptica (*Optical coherence tomography*)
- PKC- Proteína cinase C (*Protein kinase C*)
- PL – hormônio lactogênio placentário (*placental lactogen*)
- REM – Movimento rápido dos olhos (*Rapid eye moviment*)
- rhIGF- I – IGF- I recombinante humano (*recombinant human IGF-I*)
- RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
- VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH)	12
2.2 HORMÔNIO LIBERADOR DO GH (GHRH)	14
2.3 RECEPTOR DO GHRH	14
2.4 IGF- I e IGF- II	15
2.5 DEFICIÊNCIA DE GH DE ITABAIANINHA	15
2.6 RETINA	20
2.7 GH E RETINA	25
2.8 RETINOGRAFIA	27
2.9 TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	32
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
4.2 CASUÍSTICA	32
4.3 MÉTODOS	33
4.3.1 Coleta de Dados	29
4.3.2 Protocolo do Estudo	29
4.3.2 Retinografia	29
4.3.3 Tomografia de coerência óptica – Mácula	33
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4.5 ASPECTOS ÉTICOS	35
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	47
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICE A – Artigo	57
ANEXO A – Submissão do Artigo ao European Journal of Endocrinology	77
ANEXO B – Aprovação do Projeto	78

1. INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento (GH), além de seu importante papel no crescimento somático, atua em vários outros sistemas, como o sistema visual, fundamental para o desenvolvimento neuromotor, adaptação ao ambiente e capacidade de sobrevivência. A acuidade visual depende inicialmente da capacidade do sistema visual formar a imagem na retina, transformar o estímulo luminoso em estímulo nervoso e enviar este último ao córtex visual. O crescimento somático reflete o efeito do GH pituitário e de seu principal efector, o fator de crescimento insulina-símile tipo I (IGF-I), no tecido ósseo. A acuidade visual, por outro lado, pode refletir a ação ocular autócrina ou parácrina de GH, IGF-I, IGF tipo II (IGF-II) além de outros peptídeos, como o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF do termo em inglês *fibroblast growth factor*), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF do termo em inglês *vascular endotelial growth factor*) e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF do termo em inglês *platelet derived growth factor*), como demonstrado em vários vertebrados (BAUDET, ML. *et al.*, 2008); (CUTHBERTSON, R.A. *et al.*, 1989); (DAS, A.; McGUIRE, P.G., 2003); (HARVEY, S. *et al.*, 2007); (HARVEY, S. *et al.*, 2009). Em camundongos, ratos e pintos já foi documentado a expressão tanto do gene do GH como do gene do receptor do GH (GHR) na retina neural em desenvolvimento (BAUDET, ML. *et al.*, 2008).

A relação entre GH/IGFs e a vascularização da retina humana ainda não é completamente conhecida (DAS, A.; McGUIRE, P.G., 2003). As descrições históricas de regressão da neovascularização retiniana, em pacientes com retinopatia diabética, após infarto da pituitária e consequente deficiência de GH, introduziu a ablação pituitária como terapia para aquela patologia há mais de meio século (POULSEN, J.E., 1953). Mais recentemente, foi descrita diminuição da vascularização retiniana em crianças com deficiência de GH (DGH) (HELLSTRÖM, A. *et al.*, 1999) e resistência ao GH (nanismo de Laron) (HELLSTRÖM, A. *et al.*, 2002), sugerindo que o eixo GH/IGF-I é crítico para a vascularização normal da retina humana. Todavia, houve alguma sobreposição de resultados entre pacientes e controles nos dois estudos prévios, sugerindo que outros fatores devem afetar o padrão de vascularização em ambos os modelos. Os efeitos da DGH ou da resistência ao GH na retina humana podem não ser idênticos. Ambos os modelos cursam com níveis muito baixos de IGF-I mas, enquanto no primeiro existe alguma ação residual do GH, no segundo modelo a ação do GH é completamente nula. Além disso, a DGH congênita pode ser isolada ou associada a outras deficiências pituitárias, causada por vários defeitos embriológicos ou genéticos, com

consequências diretas no sistema visual (MOHNEY, B.G.; YOUNG, R.C.; DIEHL, N., 2013); (OATMAN, O.J. *et al.*, 2015).

Assim, é de grande interesse avaliar se indivíduos com deficiência isolada e congênita de GH (DIGH) apresentam algum prejuízo na neuro-vascularização retiniana. A DIGH é uma doença rara, ocorrendo em 1: 3480 a 1:10000 nascidos vivos (VIMPANI, G.V. *et al.*, 1977) e os casos atualmente diagnosticados são submetidos a tratamento de reposição com GH. Foi descrito em uma área rural do nordeste do Brasil um grupo de indivíduos com DIGH devido a mutação homozigótica (c.57+1G>A) no gene do receptor do hormônio liberador do GH (GHRH) (SALVATORI, R. *et al.*, 1999). Apesar da baixa estatura, com altura dos indivíduos adultos variando entre 107 a 136 cm em ambos os sexos (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H.; SALVATORI, R., 2011), esses indivíduos com DIGH superam eficientemente os desafios cotidianos, não apresentam problemas de desenvolvimento neurológico e têm expectativa de vida normal (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. *et al.*, 2010). Portanto, nossa hipótese é que indivíduos com DIGH apresentam uma retina com poucas alterações, o que contribui para sua capacidade de sobrevivência. O objetivo deste estudo é avaliar a neuro-vascularização retiniana nesse grupo de indivíduos portadores de DIGH congênita e não tratada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH)

O GH é um peptídeo sintetizado, armazenado e secretado pelas células somatotróficas da hipófise anterior, embora o gene que codifica este hormônio esteja expresso em vários outros tecidos, como ovários, sistemas imune, tegumentar, respiratório, digestivo e visual (HARVEY, S. *et al.*, 2007). A principal ação do GH é promover o crescimento linear somático (vida pós natal) e, para isto, exerce várias outras funções no metabolismo proteico, lipídico, glicídico e mineral, na regulação do apetite e da temperatura corporal, na função sexual e fertilidade e na resposta ao estresse, entre outras. O relevante papel do lobo anterior da hipófise na regulação do metabolismo geral foi descoberto há décadas, com descrição detalhada das alterações decorrentes da hipofisectomia total ou do lobo anterior apenas, em vários modelos animais (HOUSSAY, B.A., 1936).

O GH exerce suas ações de forma endócrina, autócrina e parácrina (estas últimas predominando nos sítios de secreção extra pituitários). Age de forma direta (como na diferenciação dos condrócitos nas áreas de crescimento das cartilagens) ou através do seu principal efetor, o fator de crescimento insulina-símile tipo I (IGF-I). O *cluster* de genes que codificam o GH humano e o hormônio lactogênio placentário (PL), também chamado somatotropina coriônica, se localiza no braço longo do cromossomo 17 e compreende cinco membros: GH-N, PL-L, PL-A, GH-V e PL-B. Esses genes apresentam 95% de similaridade entre si e cada um deles é composto por 5 exons separados por quatro introns. O gene GH-N é expresso nos somatotrofos da hipófise anterior e os outros quatro são expressos no sinciotrofoblasto placentário. O GH humano é codificado pelo gene GH-N, que codifica uma proteína de 191 aminoácidos e 22 kDa (isoforma mais abundante do GH humano) e pelo GH-V, que codifica uma isoforma placentária também de 22 kDa e difere do GH pituitário em 13 aminoácidos. As atividades somatotróficas do GH 22 kDa pituitário e do GH 22 kDa placentário são semelhantes. (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H.; SALVATORI, R., 2011); (BOGUSZEWSKI, L.C., 1997); (MELMED, S.; KLEINBERG, D., 2008); (SOUZA, A.H.O. *et al.*, 2004).

A secreção hipofisária do GH é modulada por hormônios hipotalâmicos: um estimulatório, o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e outro inibitório, a somatostatina. Estímulos periféricos também modulam a secreção do GH, a exemplo da grelina,

(hormônio produzido principalmente no estômago e também no hipotálamo), que é o ligante endógeno do GHSR (receptor específico para secretagogos do GH). Além da grelina, outros secretagogos também estimulam a secreção do GH via GHSR, que se expressa na pituitária anterior e em várias áreas do cérebro. Outros fatores como sono e hipoglicemia, além de hormônios periféricos, como os hormônios tireoidianos, glicocorticoides e esteroides gonadais, também modulam a secreção do GH. (BOGUSZEWSKI, L.C., 1997); (HARVEY, S. *et al.*, 2007); (LOW, M. J., 2008); (MARTINELLI J.R, C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H., 2008).

A existência do GH foi demonstrada em 1921 por Evans e Long (EVANS, H.M.; LONG, J.A., 1922) sendo que o isolamento e a síntese do hormônio ocorreram em 1944, por Li e Evans (LI, C.H.; EVANS, H.M., 1948).

A secreção hipofisária do GH ocorre em pulsos (6 a 10 no homem e 6 a 20 pulsos na mulher, nas 24 horas), principalmente no início das fases III e IV do sono. A periodicidade dos pulsos parece ser determinada pela somatostatina e a amplitude pelo GHRH (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H.; SALVATORI, R., 2011). O GH age se acoplando a um receptor específico da família das citocinas (GHR). Este receptor apresenta um domínio extracelular, uma porção transmembrânica e um domínio citoplasmático e a transmissão do sinal ocorre pela ativação da enzima Janus Kinase 2 (JAK 2), havendo fosforilação de outras proteínas de sinalização intracelulares, entre elas os STAT (*signal transducers and activators of transcription*) 1, 3 e 5 e componentes da via das MAP (*mitogen-activated protein*) cinases. A fosforilação do STAT-5 participa da regulação da secreção do IGF-I e da IGFBP-3 (MARTINELLI J.R, C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H., 2008); (MELMED, S.; KLEINBERG, D., 2008); (SPIEGEL, A.; CARTER-SU, C.; TAYLOR, S.I., 2008).

Uma parte do GH (40 a 60%) circula ligado a proteína ligadora de alta afinidade, a *Growth Hormone Binding Protein* (GHBP) que se constitui na porção extracelular do receptor do GH. A GHBP prolonga a meia vida do hormônio, mantém a concentração deste mais estável entre os picos de secreção e pode também ter ação inibitória (MARTINELLI J.R, C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H., 2008); (MELMED, S.; KLEINBERG, D., 2008).

O principal efector do GH, o fator de crescimento IGF-I, é sintetizado principalmente no fígado, mas também em vários outros tecidos, onde age de forma parácrina. O IGF-I extra-hepático é fundamental para o crescimento, pois este ocorre mesmo na ausência da produção hepática do fator (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H.; SALVATORI, R., 2011); (MARTINELLI J.R, C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H., 2008); (MELMED, S.; KLEINBERG,

D., 2008).

A primeira descrição de um quadro de falta de ação hormonal por alteração de receptor foi feita por Laron (LARON,Z., 1974). A síndrome de resistência ao GH ou Síndrome de Laron (SL) é decorrente de mutação no receptor do GH (GHR) e se caracteriza por altos níveis de GH com níveis muito baixos de IGF-I. O maior agrupamento com esta mutação foi descrito no Equador (GUEVARA-AGUIRRE, J. *et al.*, 1991) e na ocasião era composto por 70 indivíduos.

2.2 HORMÔNIO LIBERADOR DO GH (GHRH)

O controle neural da secreção do GH se tornou evidente após estudos em animais com lesão no hipotálamo e a demonstração de que extratos hipotalâmicos promoviam a liberação de GH. A constatação de que a secreção do GH ocorre em pulsos, obedece a um ritmo circadiano, ocorre em resposta ao estresse e cessa com a secção da haste hipofisária, confirmou inequivocamente o controle hipotalâmico. No hipotálamo humano o GHRH existe em duas formas: GHRH (1-44) NH₂ e GHRH(1-40) OH. O gene do GHRH também se expressa em outros tecidos humanos como ovário, útero e placenta, com função desconhecida. Entre as poucas funções extra pituitárias conhecidas do GHRH destaca-se o aumento do sono não REM (do termo em inglês *rapid eye movement*), período onde ocorre a maior secreção do GH. Na pituitária, o GHRH age quase unicamente sobre o GH e provoca a liberação deste hormônio em 15-45 minutos com retorno aos níveis basais em 90-120 minutos, além de agir como fator de crescimento dos somatotrofos. O GHRH varia entre as espécies, com diferentes graus de homologia ao GHRH humano: no caso do porco há 93% de homologia, sendo de 67% no rato (LOW, M. J.,2008).

2.3 RECEPTOR DO GHRH

O receptor do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRHR) pertence à família de receptores acoplados à proteína G. É uma estrutura composta por um domínio NH₂ terminal extracelular, sete hélices transmembrânicas e um domínio terminal COOH intracelular. O acoplamento do GHRH ao receptor leva à ativação da subunidade alfa da proteína G. Em consequência, há aumento da adenilciclase (ligada à membrana celular) que promove elevação do AMP cíclico (cAMP) citoplasmático, aumento de cálcio livre intracelular e consequente liberação de GH pré-formado, transcrição de RNA mensageiro e síntese de novo

GH. O gene que codifica o receptor de GHRH se localiza no braço curto do cromossomo 7. Mutações neste gene causam formas familiares de deficiência de GH, como a mutação descrita em Itabaianinha-SE (SALVATORI, R. *et al.*, 1999), indicando que nenhum outro gene pode suprir o efeito daquele específico para o receptor do GHRH (LOW, M. J., 2008); (SPIEGEL, A.; CARTER-SU, C.; TAYLOR, S.I., 2008).

2.4 IGF- I e IGF- II

O GH é principal estimulador da síntese dos fatores de crescimento insulina-símile ou *insulin like growth factor* (IGF) tipo I (IGF-I) e tipo II (IGF-II) na vida pós-natal. Moléculas de cadeia única, os IGFs I e II têm 62% de homologia entre si. O IGF-I e o IGF-II são produzidos em quase todos os tecidos e secretados à medida que são produzidos, não existindo local de armazenamento. Circulam na forma de um complexo ternário de 150 kDa, do qual também fazem parte uma proteína transportadora de IGF (IGFBP-3) e uma subunidade proteica ácido-lábil (ALS). O complexo ternário (cujos componentes têm a secreção estimulada pelo GH) funciona como um reservatório circulante. Os IGFs I e II agem se acoplando ao receptor IGF-1R (receptor de IGF tipo 1), enquanto que o IGF-II também se acopla IGF-2R (receptor de IGF tipo 2), que não sinaliza, funcionando para modular a concentração tecidual de IGF-II. Os receptores de IGFs se expressam em diversos tipos celulares, indicando ação endócrina, autócrina e parácrina. Na vida intrauterina os IGFs são menos dependentes do GH, de forma que crianças com deficiência congênita de GH são normais ou pouco afetadas em relação ao comprimento ao nascer, ao contrário de crianças deficientes em IGF-I. O IGF- II é menos dependente do GH e é mais importante na vida embrionária. As proteínas de alta afinidade IGFBP (*IGF binding protein*) são produzidas em diversos tecidos e modulam a ação dos IGFs, apresentando ações independentes destes no crescimento e apoptose celular. Seis destas proteínas já foram clonadas sendo a IGFBP-3 a mais abundante na circulação (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H.; SALVATORI, R., 2011); (MARTINELLI J.R, C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H., 2008).

2.5 DEFICIÊNCIA DE GH DESCRITA EM ITABAIANINHA

Em Itabaianinha, estado de Sergipe, foi descrito um grupo originalmente com 105 “anões” distribuídos em sete gerações (atualmente com aproximadamente 70 indivíduos) com deficiência isolada do GH (DIGH), homozigóticos para a mutação c.57+1G>A no gene que

codifica o GHRHR (SALVATORI, R. *et al.*, 1999). A substituição da guanina por adenina (Figura 1) impede a formação do RNA mensageiro do GHRHR e origina um receptor truncado e inoperante, levando à deficiência severa, congênita e vitalícia do GH (SALVATORI, R. *et al.*, 1999). É a segunda mutação descrita no gene do GHRHR. A primeira mutação foi detectada em 2 primas na Índia (WAJNRAJCH, M.P. *et al.*, 1996), em 18 paquistaneses de uma mesma família e geração – os anões de Sindh (MAHESHWARI, H.G. *et al.*, 1998) e em duas irmãs no Sri Lanka (NETCHINE, I. *et al.*, 1998), sendo idêntica ao modelo *little mouse*. A deficiência de GH dos “anões” de Itabaianinha corresponde, dentro das causas familiares de deficiência de GH, ao tipo IB que se caracteriza por herança autossômica recessiva, níveis muito baixos de GH e ausência de anticorpos anti-GH em caso de tratamento de reposição, diferindo dos tipos IA: herança autossômica recessiva, GH ausente, desenvolvimento de anticorpos anti-GH em caso de tratamento de reposição; tipo II: autossômica dominante, níveis muito diminuídos de GH, ausência de anticorpos anti-GH e tipo III: níveis muito baixos de GH, ausência de anticorpos anti-GH, muito rara, ligada ao cromossomo X, associada a complexas alterações clínicas (SALVATORI, R. *et al.*, 2001).

Os anões de Itabaianinha formam o grupo de DIGH mais numeroso, sendo a maioria não submetida a tratamento de reposição com GH, permitindo descrição detalhada das alterações decorrentes da deficiência hormonal. Os indivíduos afetados apresentam níveis muito baixos de GH, IGF- I, IGF-II, da ALS e de IFGBP-3. Não respondem a testes de estímulo, seja com GHRH, hipoglicemia insulínica, clonidina ou outros secretagogos semelhantes à grelina que atuam no GHSR, sugerindo que os vários estímulos agem via GHRH. (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H.; SALVATORI, R., 2011); (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. *et al.*, 1999).

Este grupo de pesquisa já descreveu diversas características desta população: acentuada baixa estatura proporcionada de início pós-natal, com altura final variando entre 107 e 136 cm ou -9,6 a -5,1 desvios-padrão abaixo da média estatural, sendo que mãos, pés, membros, tórax, cintura pélvica e crânio são proporcionalmente reduzidos (Figura 2) (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H.; SALVATORI, R., 2011). Enquanto a redução do crescimento ósseo é proporcionada, mostrando uma ação homogênea do GH naquele tecido, nos tecidos não ósseos as alterações são variadas: a pituitária anterior é hipoplásica (OLIVEIRA, H.A. *et al.*, 2003); a tireoide (ALCÂNTARA, M.R.S. *et al.*, 2006), a massa ventricular esquerda (BARRETO-FILHO, J.A.S. *et al.*, 2002), o útero e o baço são menores; próstata e ovários são equivalentes, enquanto rins, pâncreas e fígado são maiores (dimensões corrigidas para a superfície corporal) (OLIVEIRA, C.R.P. *et al.*, 2008 a). A resistência óssea (medida por ultrassonografia do calcâneo) é menor, sem maior propensão a fraturas (PAULA, F.J. *et al.*,

2009). A voz apresenta um timbre agudo, com frequência fundamental (f_0) aumentada, mesmo em comparação com outros grupos com baixa estatura por outras causas. Isto indica que a falta de GH provoca alterações específicas na conformação da face (OLIVEIRA-NETO, L.A. *et al.*, 2011) e do aparelho fonador e consequentemente na qualidade da voz (VALENÇA, E. H. O. *et al.*, 2012). Estas alterações neutralizam, na DIGH, as modificações peculiares aos sexos feminino e masculino que ocorrem tanto na puberdade como na senescência, mantendo na população com DIGH de Itabaianinha -SE uma voz com padrão pré-puberal em ambos os sexos (VALENÇA, E. H. O. *et al.*, 2015). Os anões apresentam queixas de tontura e misofonia mais frequentemente que os controles e apresentam leve perda auditiva para altas frequências, além de menores escores para discriminação da fala (PRADO-BARRETO, V.M. *et al.*, 2014). Em relação aos aspectos metabólicos, já foi relatado a menor quantidade de massa magra e aumento percentual de gordura, com predomínio de gordura abdominal, alterações que são encontradas desde a infância e que persistem até a vida adulta (OLIVEIRA, C. R. P. *et al.* 2008, b); (OLIVEIRA, C. R. P. *et al.*, 2011). O colesterol total e LDL (*low density lipoprotein*) são aumentados também já desde a infância e igualmente persistem durante toda a vida (GLEESON, H.K. *et al.*, 2002), enquanto que os níveis de insulina e do índice de resistência à insulina, o HOMA-IR, são menores (OLIVEIRA, J.L.M. *et al.*, 2006). Os anões de Itabaianinha não apresentam hipoglicemia na infância, como costuma ocorrer em outros tipos de deficiência de GH e, ao contrário da deficiência de GH de início na idade adulta, apresentam aumento de sensibilidade à insulina. (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H.; SALVATORI, R., 2011); (OLIVEIRA, J.L.M. *et al.*, 2006). A fertilidade nesta população é normal, a puberdade algo atrasada, a paridade diminuída e o climatério é antecipado (MENEZES, M. *et al.*, 2008). Não apresentam comprometimento da qualidade de vida (BARBOSA, J.A.R. *et al.*, 2009) e a longevidade é normal (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. *et al.*, 2010).

Modelo de Resistência ao GHRH

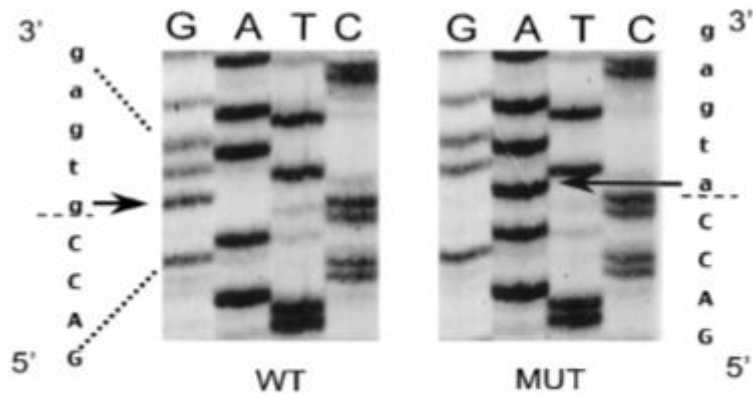


Figura 1. Mutação homozigótica no sítio de *splicing* do íntron 1 do gene do receptor do GHRH, Guanina → Adenina (c.57+1G>A), na DIGH de Itabaianinha. WT – não mutado; MUT – mutado (Com permissão de SALVATORI, R. *et al.*, 1999).



Figura 2. Anões de Itabaianinha com a equipe de pesquisa. Foto ilustra a baixa estatura proporcionada. Foto: acervo pessoal do autor.

2.6 RETINA

Camada mais interna do bulbo ocular, situa-se entre a coróide e a câmara vítrea (Figura 3). O estímulo luminoso que incide na retina é codificado em estímulo nervoso e então transmitido ao córtex visual primário, situado no lobo occipital. Esta camada pode ser dividida em dois componentes: o epitélio pigmentar da retina e a retina neural propriamente dita, onde situam-se os fotorreceptores (cones e bastonetes).

Dez camadas compõem a retina, no sentido de fora para dentro (Figuras 4 e 5):

1. Epitélio Pigmentado da Retina – não faz parte da retina neural, mas está intimamente associada a ela
2. Camada de bastonetes e cones – constituída pelos segmentos interno e externo dos fotorreceptores
3. Membrana limitante externa – limite apical das células de Müller
4. Camada Nuclear Externa – composta pelos núcleos dos cones e bastonetes
5. Camada Plexiforme Externa – constituída pelos axônios dos cones e bastonetes e pelos prolongamentos das células horizontais e amácrinas (neurônios associativos), células de Müller (célula de sustentação) e células bipolares (neurônios condutores)
6. Camada Nuclear Interna – onde se situam os núcleos das células bipolares, amácrinas, horizontais e de Müller
7. Camada Plexiforme Interna – corresponde aos prolongamentos das células da camada anterior, onde ocorrem as sinapses entre as células da camada nuclear interna e as células ganglionares
8. Camada de Células Ganglionares – composta pelos núcleos das células ganglionares da retina
9. Camada de Fibras Nervosas – constituída pelos axônios das células ganglionares que, juntos, formam o nervo óptico.
10. Membrana Limitante Interna – corresponde à lâmina basal das células de Müller

Na parte posterior da retina, correspondendo ao polo posterior do eixo óptico do olho, existe uma depressão, a fóvea, de cerca de 1,5 milímetro de diâmetro. No centro desta está a foveola, constituída basicamente pelos fotorreceptores (principalmente cones), sendo a área mais sensível da retina. A fóvea é circundada por uma região chamada mácula lútea e, como na fóvea, nesta área não existem vasos sanguíneos, permitindo à luz chegar sem impedimento aos fotorreceptores (Ross, M. H.; PAWLINA, W., 2011). Também na parte

posterior da retina existe uma região para onde convergem as fibras nervosas que formarão o nervo óptico, chamada disco óptico. Nesta área não existem fotorreceptores, sendo o disco óptico um ponto cego. É pelo centro do disco óptico, região denominada escavação ou *cup*, que emergem para dentro do bulbo ocular os vasos retinianos. A artéria e a veia retinianas, ao penetrar no bulbo ocular, se dividem em dois ramos – superior e inferior e cada um destes se subdivide em ramos nasal e temporal. A artéria retiniana nutre as camadas mais internas da retina, sendo as camadas mais externas nutridas por difusão, pelos vasos da coroide (Ross, M. H.; PAWLINA, W., 2011).

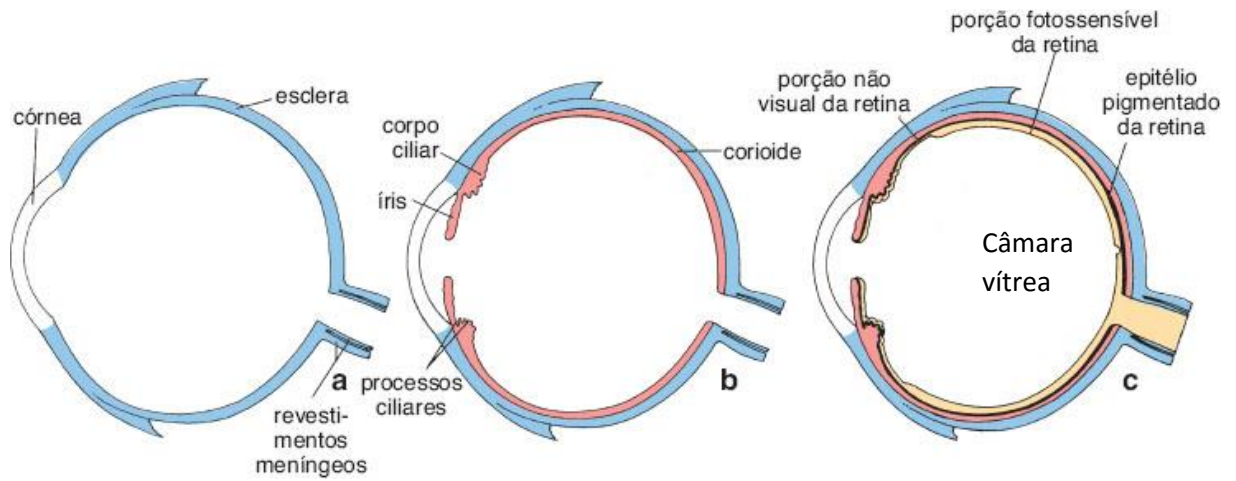


Figura 3. Diagrama ilustrando as camadas que compõem o bulbo ocular humano (Adaptado de ROSS, M. H.; PAWLINA, W., 2011).

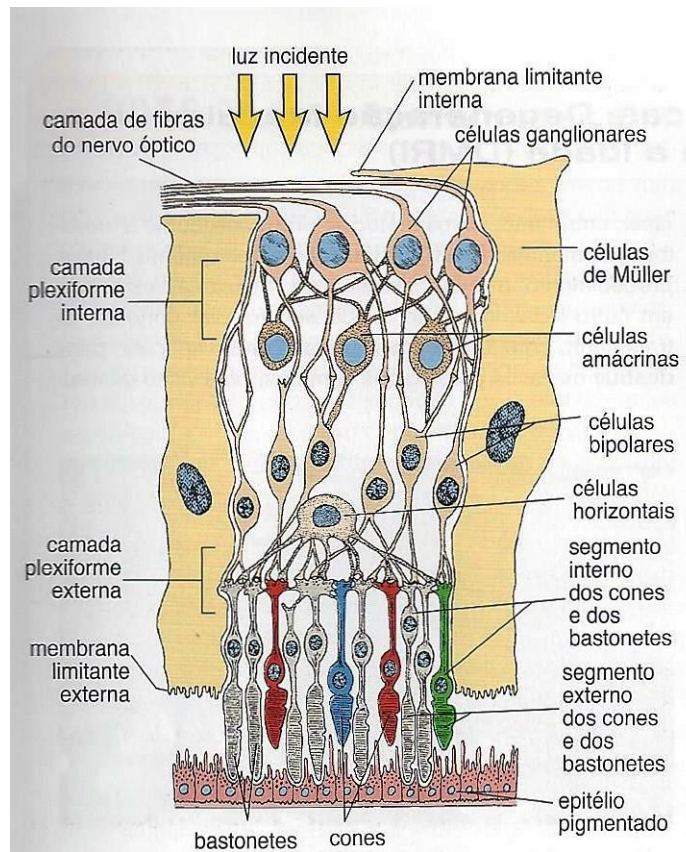


Figura 4. Diagrama ilustrando as camadas da retina (Adaptado de ROSS, M. H.; PAWLINA, W., 2011).

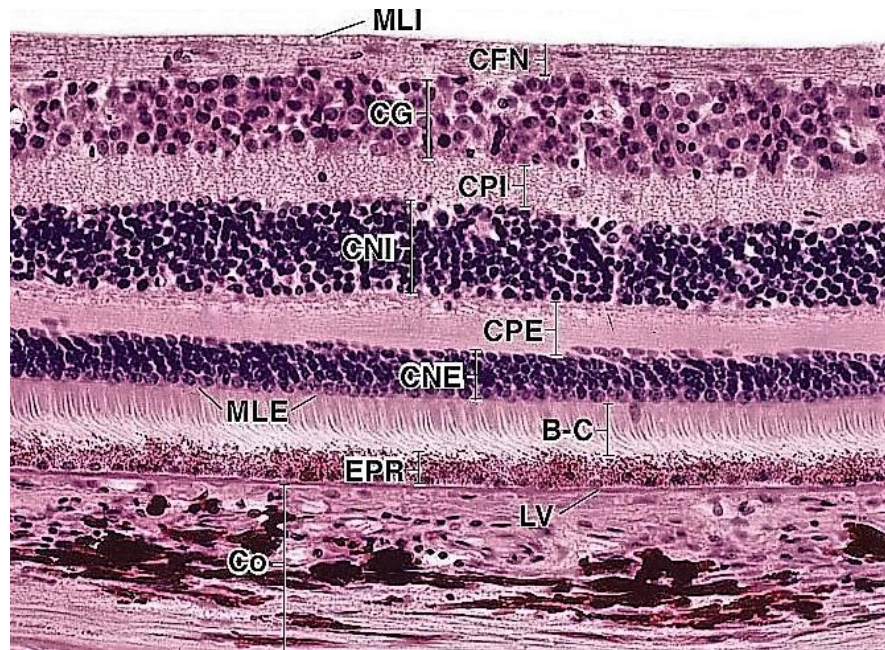


Figura 5. Fotomicrografia de retina humana. 440X. Co-coroide; LV-lâmina vítrea; EPR- epitélio pigmentado da retina; B-C- bastonetes e cones; MLE- membrana limitante externa; CNE- camada nuclear externa; CPE- camada plexiforme externa; CNI- camada nuclear interna; CPI- camada plexiforme interna; CG- células ganglionares; CFN- camada de fibras nervosas; MLI- membrana limitante interna (Adaptado de ROSS, M. H.; PAWLINA, W., 2011).

2.7 GH E RETINA

O gene do GH se expressa em vários tecidos, além da pituitária – sistemas nervoso, digestivo, respiratório, imune, reprodutivo, tegumentar e, mais recentemente documentado, no sistema visual. Estes achados demonstram que, além de sítios de ação, esses tecidos são produtores de GH. O gene do GHR segue o mesmo padrão de distribuição, indicando que aqueles tecidos são sítios de ação do hormônio. A ação do GH nesses tecidos ocorre tanto diretamente quanto via IGF- I (BAUDET, ML. *et al.*, 2008); (HARVEY, S. *et al.*, 2007); (HARVEY, S. *et al.*, 2003).

Nos peixes e anfíbios, o GH age diretamente ou via IGF-I e promove a proliferação de células da retina e do cristalino, respectivamente (HARVEY, S. *et al.*, 2007).

Os pintos já eclodem dos ovos com o sistema visual bem formado, apesar dos somatotrofos da pituitária só se diferenciarem nos últimos dias de incubação e de não haver GH circulante até o último dia de vida embrionária (HARVEY, S. *et al.*, 1998). O desenvolvimento ocular, entretanto, não ocorre na ausência de GH, já que este está presente nos diversos tecidos oculares destas aves – córnea, esclera, coróide, cristalino, humor vítreo, epitélio pigmentar da retina, células ganglionares da retina e seus axônios e no cérebro (na área de projeção da retina), desde a vida embrionária precoce, antes mesmo do desenvolvimento da pituitária. Esses dados, então, indicam que o desenvolvimento do sistema visual das galinhas ocorre na ausência do GH pituitário. O vítreo de embriões precoces apresenta GH em níveis comparáveis aos da pituitária adulta. O GH-mRNA nos tecidos oculares tem 100% de homologia com o GH-mRNA do GH pituitário. Desde o início da vida embrionária das aves o GHR-mRNA é detectável nos tecidos oculares, confirmando serem estes tecidos um sítio de produção do GHR. Da mesma forma que em outras espécies, o GH nesses animais age de forma autócrina e parácrina (BAUDET, ML. *et al.*, 2008); (HARVEY, S. *et al.*, 1998); (HARVEY, S. *et al.*, 2007).

Em roedores, o GH é encontrado nas camadas de células ganglionares (onde se detecta a presença do GH-mRNA), camada de fibras nervosas, plexiforme interna, nuclear interna e também nas células endoteliais, confirmando ser a retina neural um local de produção do GH. O GHR/GHBP são encontrados em todas as células da retina neural, não só em ratos neonatos, mas já desde a vida embrionária, sendo particularmente abundantes na camada de células ganglionares. Este achado sugere ser a retina neural também um importante sítio de ação do GH. A camada neuroblástica é composta por células em proliferação, na fase pós mitótica, reiterando o papel do GH na retina *in vivo*. Fora da retina, o GH está presente no nervo óptico,

quiasma e trato ópticos, além de vítreo e cristalino (BAUDET, ML. *et al.*, 2008); (HARVEY, S. *et al.*, 2007). A importância do GH no sistema visual pode ser evidenciada pelas alterações fenotípicas encontradas em ratos com nocaute do gene do GH (GH $-/-$): diminuição do comprimento axial do olho e diminuição da espessura da retina, esta devido à menor espessura das camadas de fibras nervosas, plexiforme interna e neuroblástica, mas não da camada de células ganglionares. Estas modificações decorrem de alteração nos níveis de quatro proteínas do proteoma retiniano: diminuição da proteína *brain abundant membrane attached signal protein-1* (BASP-1) e aumento do inibidor 1 da proteína cinase C (PKC inibitor-1), da ciclofilina A e da *Sam68-like mammalian protein 2* (SLM-2) (BAUDET, ML. *et al.*, 2008), todas estas relacionadas à angiogênese, neuroproliferação e sinaptogênese da retina. Além destas evidências, Cuthbertson (CUTHBERTSON, R.A. *et al.*, 1989) demonstrou a presença do IGF-II em córnea e esclera em desenvolvimento de embriões de ratos.

No porco, o IGF- I quando injetado no vítreo, provoca proliferação vascular semelhante àquela encontrada no diabetes mellitus (DANIS, R. P.; BINGAMAN, D. P., 1997); (HARVEY, S. *et al.*, 2007).

A relação entre o GH e o sistema visual humano já foi demonstrada em alguns estudos. O GH foi detectado no sistema nervoso central (SNC) de fetos humanos e no vítreo de pacientes sem e com doença ocular (retinopatia diabética, descolamento de retina e hemorragia vítrea) (BAUDET, ML. *et al.*, 2008); (HARVEY, S. *et al.*, 2007); (HARVEY, S. *et al.*, 2009).

O papel da retina como sítio de ação e síntese de GH só foi conhecido recentemente (BAUDET, ML. *et al.*, 2008). A propriedade angiogênica do GH já foi documentada há décadas, assim como a capacidade de estimular a proliferação de células endoteliais retinianas *in vitro* (RYMASZEWSKI, Z.; COHEN, R.M.; CHOMCZYNSKI, P., 1991). O aumento de GH no diabetes mellitus mal controlado e o uso bem sucedido de drogas que bloqueiam a secreção ou a ação de GH no tratamento de retinopatia diabética comprova o papel deste hormônio, diretamente ou através de fatores de crescimento por ele estimulados, na neovascularização retiniana característica desta doença (WILSON, S.H. *et al.*, 2001). A ocorrência de retinopatia durante tratamento de reposição de GH reforça os achados anteriores (HARVEY, S. *et al.*, 2007), assim como os vários relatos de regressão de retinopatia diabética consequente à diminuição dos níveis de GH por apoplexia hipofisária (POULSEN, J.E., 1953); (WRIGHT, A.D. *et al.*, 1969). O mecanismo pelo qual o GH estimula angiogênese não é conhecido, possivelmente agindo como fator permissivo para fatores de crescimento circulantes ou produzidos localmente, como, por exemplo, o IGF- I e o VEGF (HELLSTRÖM, A. *et al.*, 2002). Crianças prematuras que não desenvolvem retinopatia da prematuridade apresentam

níveis crescentes de IGF- I logo após o nascimento, ao contrário daquelas que desenvolvem a doença. A retinopatia da prematuridade é uma patologia decorrente da hipóxia existente em área avascular da retina, levando à produção de fatores locais de crescimento como o VEGF. Na ausência de IGF- I, mesmo havendo acúmulo de VEGF, não ocorre adequado crescimento de novos vasos sanguíneos (HELLSTRÖM, A. *et al.*, 1999); (HELLSTRÖM, A. *et al.*, 2002). É necessário que o IGF- I esteja presente em níveis adequados: se os níveis são baixos, ocorre apoptose e se elevados, promove proliferação aberrante das células endoteliais da retina (WILSON, S.H. *et al.*, 2001).

Pacientes com deficiência de GH ou de IGF- I apresentam diminuição da vascularização retiniana, inclusive os pacientes tratados com GH ou com IGF-I recombinante humano (rhIGF-I), já que angiogênese retiniana ocorre fundamentalmente no período fetal (HELLSTRÖM, A. *et al.*, 1999); (HELLSTRÖM, A. *et al.*, 2002); (ROTH, A.M., 1977). Isto sugere que o IGF- II, crítico para o crescimento somático e ocular fetal (CUTHBERTSON, R.A. *et al.*, 1989), possa também influenciar a vascularização retiniana.

2.8 RETINOGRRAFIA

A avaliação das estruturas da retina foi inicialmente feita pela oftalmoscopia. O primeiro oftalmoscópio direto, inventado em 1851 por Hermann Von Helmholtz, permitia a visualização de pequeno campo (8 a 10 graus). Em 1911, Allvar Gullstrand, oftalmologista sueco, ganhador do prêmio Nobel por trabalhos sobre óptica do olho, criou o oftalmoscópio indireto sem reflexos, que permitia a visualização de grande campo (60 graus) (FERREIRA, T.V., 2012). Trata-se de exame de grande importância, não só para a oftalmologia, mas também para outras especialidades, como endocrinologia, neurologia, cardiologia, e outras (PAULA, A., 1998). A retinografia oferece melhor acurácia, permite o registro da imagem e é usualmente complementada com angiografia. A figura 6 mostra as principais estruturas do fundo do olho obtida por retinografia. A figura 7 mostra os detalhes do disco óptico, da escavação e da rima (parte compreendida entre a escavação e as bordas do disco óptico), em imagem obtida por retinografia.

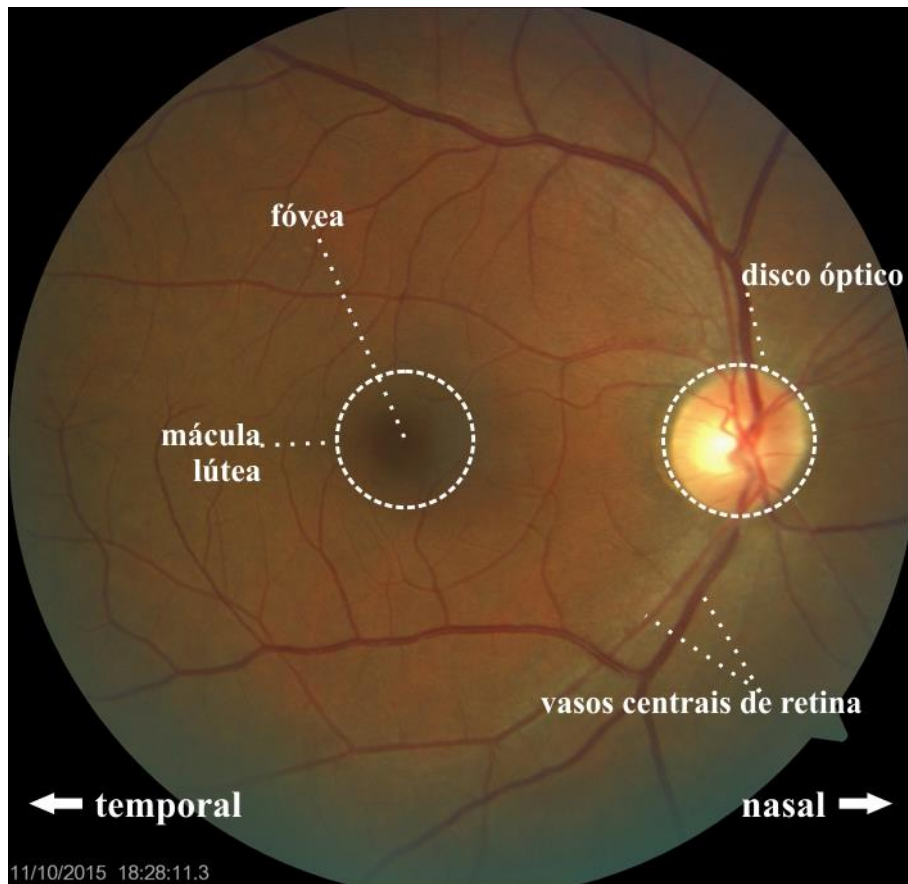


Figura 6. Fundo de olho normal de indivíduo do grupo controle (retinografia do olho direito), destacando-se as estruturas analisadas neste trabalho.

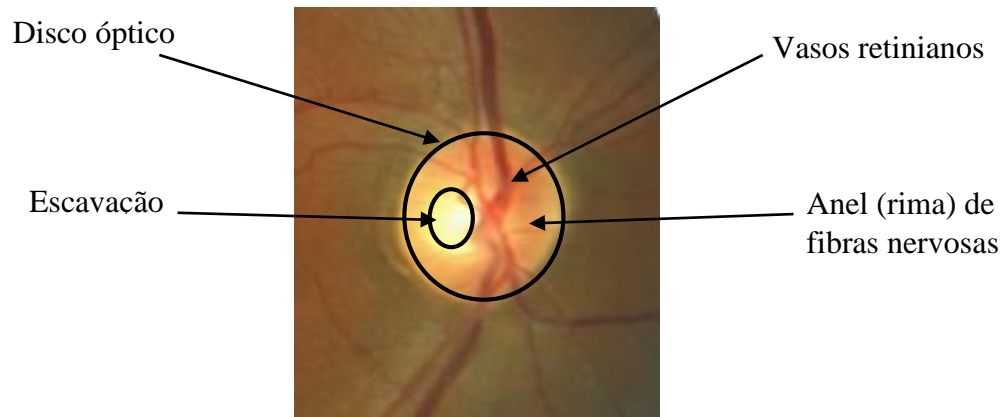


Figura 7. Nervo óptico normal em maior detalhe. Imagem obtida por retinografia de indivíduo do grupo controle, mostrando o disco óptico, a escavação, a rima (anel de fibras nervosas) e os vasos retinianos.

2.9 TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)

A OCT é um método de imagem óptica não invasivo e funciona de modo análogo ao ultrassom no modo B sendo que, ao invés de ondas sonoras, emite luz com comprimento de onda infravermelho. A absorção ou reflexão da luz em intensidade própria a cada tecido, forma a imagem. O método realiza imagens transversais da retina, em alta resolução (10 μ m), semelhante à microscopia óptica, sem necessitar biópsia cirúrgica, denominada “biópsia óptica” (BOUCAULT, F.C. *et al.*, 2011). O método de interferometria de baixa coerência utilizado pela OCT produz imagem em duas dimensões, em varredura, dos tecidos oculares (HUANG, D. *et al.*, 1991). O método possibilita obter imagens transversais do nervo óptico, cabeça do nervo óptico e da espessura da camada de células ganglionares da retina. Este método oferece maiores detalhes da anatomia e morfologia retiniana que outras técnicas de imagem, como a angiofluoresceinografia e ultrassonografia, possibilitando avaliar a retina qualitativa e quantitativamente (SAKATA, L.M. *et al.*, 2009). A figura 8 ilustra um resultado normal de OCT de indivíduo do grupo DIGH.

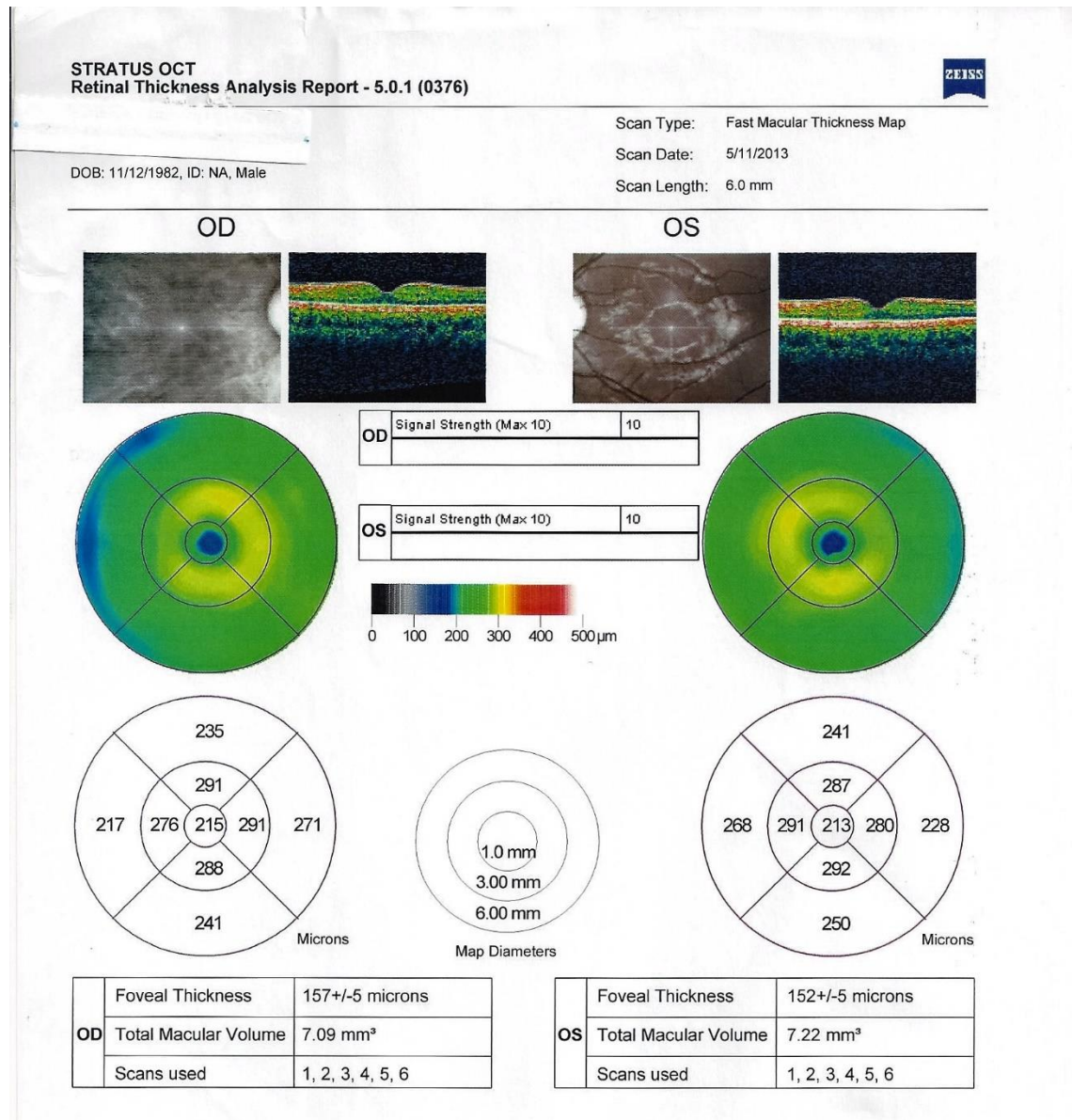


Figura 8. Resultado normal de OCT (Stratus 3000) de indivíduo do grupo DIGH.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a neuro-vascularização da retina de indivíduos com deficiência isolada, congênita e vitalícia de GH (DIGH).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o número de ramificações nos vasos da retina

Avaliar a morfologia do disco óptico

Avaliar a morfologia da escavação

Avaliar a espessura da mácula.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal, analítico, com grupo controle

4.2 CASUÍSTICA

Os participantes deste estudo foram recrutados por convite oral ou por escrito, endereçado à Associação do crescimento e desenvolvimento humano de Itabaianinha. Todos os participantes, casos e controles, são da mesma região, pareados por idade e sexo.

Critérios de inclusão: para DIGH o genótipo homozigótico para a mutação c.57+1G>A no gene do GHRH-R enquanto que para o grupo controle o genótipo homozigótico normal. Os critérios de exclusão para ambos grupos foram tratamento prévio de reposição com GH e ocorrência de outras doenças genéticas ou adquiridas que pudessem alterar o aspecto do fundo do olho como glaucoma, diabetes mellitus com hemoglobina glicada > 8%, retinopatia diabética e hipertensão arterial sistêmica cujo controle necessitasse de mais de quatro drogas hipotensoras. Vinte e cinco DIGH e 28 controles preencheram estes critérios e foram

submetidos a uma investigação oftalmológica completa, cujos dados relativos à retina serão mostrados neste trabalho.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Coleta De Dados

A coleta de dados foi realizada no Hospital Ocular, em Aracaju.

4.3.2 Protocolo do Estudo

Todos os indivíduos foram submetidos a avaliação oftalmológica completa, incluindo retinografia sem contraste (Visucam 500, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) e tomografia de coerência óptica (OCT) (aparelho Stratus, Carl Zeiss Meditec Inc. Dublin, CA, USA, modelo 3000). A retinografia e a OCT foram realizadas em cicloplegia medicamentosa. As fotos foram analisadas pela Dra. Ann Hellström, professora titular de oftalmopediatria da Sahlgrenska Academy, The Queen Silvia Children's Hospital, Göteborg, Suécia.

4.3.3 Retinografia

As retinografias deste trabalho foram avaliadas por um mesmo observador e com cegamento em relação ao grupo. Somente fotos muito bem focadas foram avaliadas, sendo avaliados 11 DIGH e 17 Controles quanto ao número de pontos de ramificação vascular. A seleção das fotos aptas para análise foi feita pelo avaliador. Ambos os olhos foram avaliados, sem discrepância entre ambos em relação aos pontos de ramificação vascular. A avaliação da vascularização foi feita de forma semiquantitativa, a partir da grande experiência do avaliador. (HELLSTRÖM, A. *et al.*, 1999; HELLSTRÖM, A. *et al.*, 2002).

A classificação inicial resultou nas seguintes categorias: nenhuma redução, redução leve, redução moderada e redução severa. Como no grupo DIGH não houve nenhum indivíduo

na classificação nenhuma redução e nenhum dos controles na classificação leve, nós agrupamos nenhuma redução e redução leve em uma categoria final: mínima redução. A mesma examinadora avaliou o disco óptico (classificando como normal, diminuído e aumentado) e a escavação (classificando como normal ou aumentada) em 14 DIGH e 28 controles (um dos controles teve apenas o disco óptico avaliado).

4.3.4 Tomografia de coerência óptica (OCT)

A OCT, para avaliação da espessura da mácula, foi realizada em 25 DIGH e 22 Controles. Foi obtida a média da espessura dos dois olhos de cada indivíduo, em cada uma das nove regiões da mácula (fóvea, temporal interna, superior interna, nasal interna, inferior interna, temporal externa, superior externa, nasal externa e inferior externa).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão. As variáveis categóricas foram expressas em valores absolutos e porcentagem. O teste *t* de Student foi usado para comparar as variáveis contínuas e o teste exato de Fischer para as variáveis categóricas. O software utilizado foi o IBM®SPSS® versão 20.0. O valor de *p* utilizado foi 0,05.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Sergipe, nº CAAE- 0112.0.107.000-11 de 6 de maio de 2011.

5. RESULTADOS

Não houve diferença na distribuição por gênero (DIGH, 13 homens em 25 indivíduos e no grupo controle 14 homens em 28 indivíduos, $p=1,0$), nem por idade (DIGH, idade média de 50,9 anos [12,0] e controles 46,4 anos [14,7], $p=0,244$). A altura, conforme esperado, foi bastante reduzida no grupo DIGH em relação ao grupo controle (1,25 m [0,10] *versus* 1,63m [0,10], $p<0,0001$).

A tabela 1 mostra a redução das ramificações nos vasos retinianos na DIGH e controles, em números absolutos e porcentagem, nas categorias iniciais. A classificação final é mostrada na figura 9. O Teste Exato de Fisher mostrou que indivíduos com DIGH apresentam maior redução dos pontos de ramificações vasculares em comparação aos controles, $p=0,049$. Da mesma forma, a porcentagem de redução moderada na DIGH foi maior que nos controles (91% na DIGH *vs.* 53% nos controles, $p=0,01$). A tabela 2 mostra o número e a porcentagem de indivíduos com disco (92,9% *vs.* 57,1%) e escavação (92,9% *vs.* 66,7%) aumentados. As figuras 10 e 11 mostram que a taxa de indivíduos com aumento do disco óptico e da escavação foi maior na DIGH que nos controles ($p<0,0001$ em ambos os casos). A porcentagem de indivíduos com aumento do disco e da escavação foi significativamente maior nos indivíduos com DIGH do que nos controles ($p=0,005$ e $p=0,028$, respectivamente). A tabela 3 mostra que não houve diferença na espessura da fóvea e de mais oito regiões da mácula (valores expressos em micrômetros). Todos os resultados de OCT foram normais, tanto no grupo DIGH como no grupo controle.

A figura 12 mostra a redução dos ramificações vasculares, aumento de disco óptico e da escavação em um indivíduo com DIGH em comparação com indivíduo controle.

Tabela 1. Redução dos pontos de ramificação dos vasos da retina em 11 DIGH e 17 controles, em números absolutos e porcentagem.

	Nenhuma	Leve	Moderada	Total
DIGH	0/0	1 (9,1%)	10 (91%)	11
Controle	8 (47%)	0 (0%)	9 (53%)	17

Teste Exato de Fisher mostrou que indivíduos com DIGH apresentam redução do número de ramificações vasculares em comparação com os controles ($p=0,0491$). A porcentagem de moderada redução na DIGH foi maior que nos controles ($p=0,01$).

Tabela 2. Tamanho do disco óptico e da escavação em indivíduos com DIGH e controles em números absolutos e porcentagem.

Disco Óptico			
DIGH	NORMAL		AUMENTADO
	1 (7,1 %)		13 (92,9 %)
CONTROLE	12 (42,9 %)		16 (57,1 %)
		P<0,0001	
Escavação			
DIGH	NORMAL		AUMENTADA
	1 (7,1 %)		13 (92,9 %)
CONTROLE	9 (33,3 %)		18 (66,7 %)
		P<0,0001	

Tabela 3. Dados da tomografia de coerência óptica (OCT) da mácula em 25 DIGH e 22 controles, em micrômetros.

	DIGH	Controle	p
Fóvea	197,1 (34,8)	197,3 (23,2)	0,983
Temporal Interna	253,0 (29,6)	252,9 (21,3)	0,990
Superior Interna	266,1 (34,8)	268,3 (18,8)	0,786
Nasal Interna	267,7 (36,0)	268,0 (19,7)	0,968
Inferior Interna	269,3 (35,5)	260,7 (21,5)	0,760
Temporal Externa	219,2 (20,9)	220,8 (17,7)	0,777
Superior Externa	233,4 (23,6)	235,9 (17,3)	0,672
Nasal Externa	255,1 (26,7)	253,5 (26,0)	0,832
Inferior Externa	235,2 (20,4)	232,9 (18,4)	0,683

Dados em média e desvio padrão.

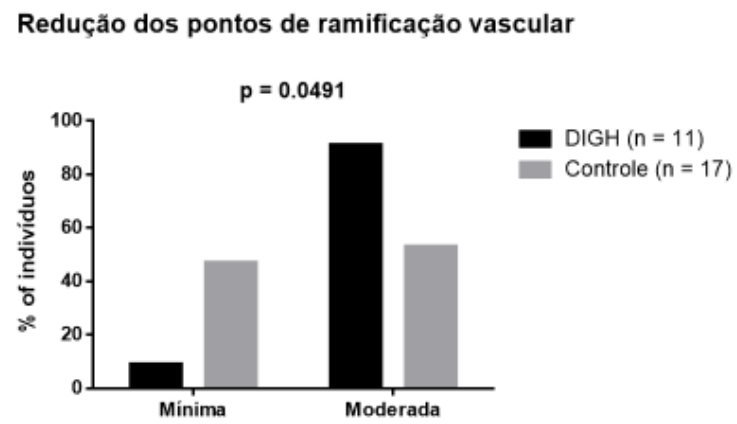


Figura 9. Redução dos pontos de ramificação vascular na DIGH e controles em porcentagem.

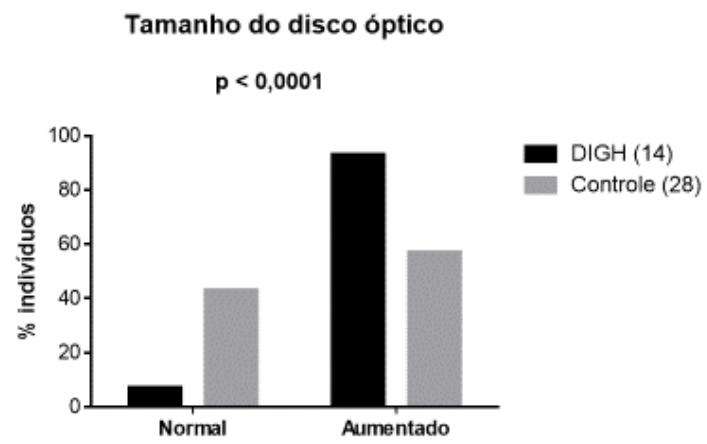


Figura 10. Porcentagem de aumento do disco óptico em indivíduos com DIGH e controles

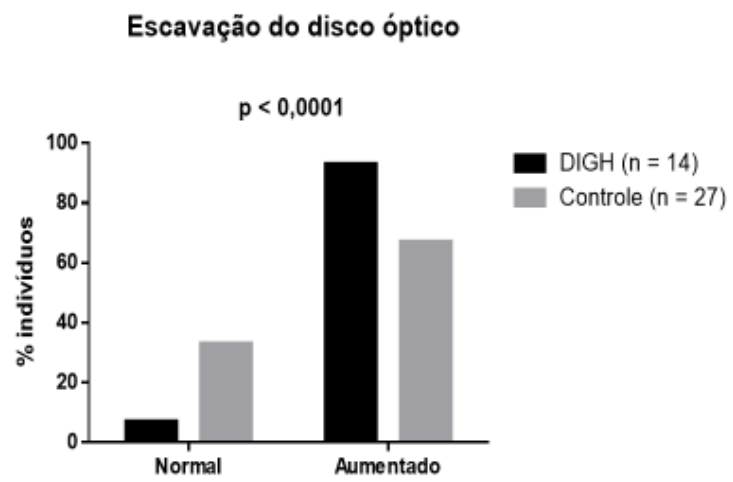


Figura 11. Porcentagem de aumento da escavação em indivíduos com DIGH e controles.

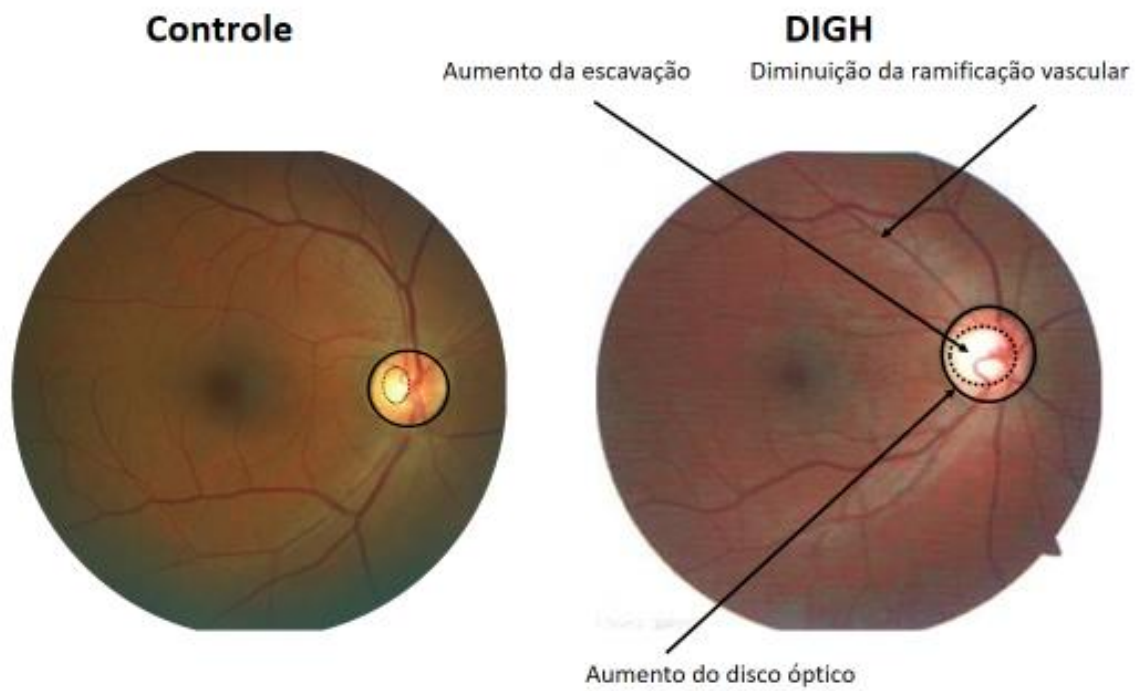


Figura 12. Comparação entre o fundo de olho de indivíduo com DIGH e controle em relação ao disco óptico, escavação e vascularização retiniana

6. DISCUSSÃO

Este trabalho descreve três principais achados em indivíduos adultos portadores de DIGH, não tratados. O primeiro achado, redução moderada do número pontos de brotamentos ou ramificações vasculares nos vasos da retina; o segundo, o aumento do disco óptico e da escavação; o terceiro, a espessura normal da mácula.

Apenas um trabalho mostrou o padrão da vascularização retiniana em 39 crianças e adolescentes (idade 3,6-18,7 anos) com DGH congênita (seis com múltiplas deficiências), a maioria dos indivíduos já tratados ou em tratamento (HELLSTRÖM, A. S. *et al.*, 1999). Outro estudo mostrou 11 indivíduos com resistência ao GH (Síndrome de Laron), com idade 10-40 anos (HELLSTRÖM, A. *et al.*, 2002). Em ambos os estudos foi demonstrada redução do número de ramificações vasculares, aparentemente mais acentuada na Síndrome de Laron. Todavia, houve alguma sobreposição de resultados entre pacientes e controles nos dois estudos prévios, sugerindo que outros fatores devem afetar o padrão de vascularização em ambos os modelos. Considerando que a deficiência de IGF-I é comum a ambas as condições (GHD e Síndrome de Laron), este fator é considerado como sendo crítico para a vascularização normal da retina humana.

Os dados do nosso modelo de DIGH parecem concordar com aqueles achados, embora a magnitude da redução tenha sido predominantemente moderada. Esses achados sugerem a possibilidade de haver mecanismo(s) compensatório(s) na DIGH devido à mutação no gene do GHRHR. A vascularização retiniana ocorre normalmente no período fetal (ROTH, A.M., 1977), de modo que a vascularização pode ser influenciada mais pelo fator de crescimento insulina-símile tipo II (IGF-II), considerado mais relevante para o desenvolvimento somático e ocular fetal (CUTHBERTSON, R.A. *et al.*, 1989) que pelo IGF-I. Curiosamente, os indivíduos com DIGH de Itabaianinha, apesar dos níveis baixos, exibem maior biodisponibilidade de IGF-II (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. *et al.*, 1999), o que poderia influenciar a vascularização retiniana, neutralizando a redução do IGF-I da DGH. A redução mais acentuada no número de ramificações vasculares na resistência ao GH pode refletir a ausência do efeito angiogênico direto do GH nos vasos da retina. O nosso achado de redução de ramificações vasculares na DIGH, está em consonância com os trabalhos anteriores.

O segundo achado deste trabalho é o aumento tanto do disco óptico como da escavação do disco, provavelmente com menor comprometimento da área da rima (área compreendida entre a escavação e a borda do disco óptico) e possível preservação do número de células ganglionares da retina (CGR). A sobrevivência das CGR é muito dependente do GH ocular,

como indica a presença tanto do GH como do GHR nestas células (NALCACIOGLU-YUKSEKKAYA, P. *et al.*, 2014). O GH pituitário e o IGF-I circulante não são decisivos para o peso ao nascer, pois crianças com DIGH devido a mutação no GHRHR apresentam peso normal ao nascimento (AGUIAR-OLIVEIRA, M.H.; SALVATORI, R., 2011). Já foi demonstrado que a presença do GH e o GHR na retina ainda na vida embrionária precoce e o efeito destes no desenvolvimento das CGR, pode explicar a diminuição da camada de fibras nervosas (não avaliada neste estudo) em algumas crianças com DGH (NALCACIOGLU-YUKSEKKAYA, P. *et al.*, 2014). Aumento do disco óptico é comumente considerado um marcador de alteração no desenvolvimento neurológico. Disco óptico normal (NALCACIOGLU-YUKSEKKAYA, P. *et al.*, 2014), diminuído ou aumentado foram previamente descritos na GHD (COLLET-SOLBERG, P.F. *et al.*, 1998), possivelmente refletindo uma multiplicidade de causas da deficiência de GH. Enquanto a hipoplasia do nervo óptico está frequentemente ligada à displasia septo-óptica (MOHNEY, B.G.; YOUNG, R.C.; DIEHL, N., 2013), foi sugerido que o aumento do disco óptico poderia predizer a possibilidade de DGH em uma criança com severa baixa estatura (COLLET-SOLBERG, P.F. *et al.*, 1998). Nossos achados então, parecem corroborar essa hipótese. Assim, o aumento do disco óptico, à semelhança das alterações da voz (VALENÇA, E. H. O. *et al.*, 2012) e das medidas craniofaciais (OLIVEIRA-NETO, L.A. *et al.*, 2011), pode fazer parte do quadro clínico da DIGH congênita. Por outro lado, a presença de um disco óptico aumentado em pacientes em uso de GH, porém sem sinais de hipertensão intracraniana e sem hemorragias pericapilares radiais ou obscurecimento de vasos retinianos nas margens do disco óptico, não constituem pseudo tumor cerebral e não precisam de suspensão do tratamento ou investigações dispendiosas, conforme sugerido há aproximadamente duas décadas, em um numero pequeno de pacientes (COLLET-SOLBERG, P.F. *et al.*, 1998). Desta forma, embora a relevância clínica destes dados não seja assegurada, a relevância do aumento do disco óptico no quadro clínico da DGH é incontestável. Neuro- oftalmologistas e endocrinologistas são beneficiados com esta informação e devem incorporá-las em suas práticas.

O terceiro achado de nosso estudo é a espessura normal da mácula, avaliada pela OCT, técnica que fornece informações detalhadas da anatomia e morfologia retinianas em cortes transversais (HUANG, D. *et al.*, 1991) (SAKATA, L.M. *et al.*, 2009). Não existem trabalhos publicados sobre OCT na DIGH congênita. Estudos em indivíduos com nanismo de Laron (Síndrome de Laron) também mostram normalidade na espessura mácula e na arquitetura da retina (BOURLA, D.H.; WEINBERGER, D., 2011). Nossos dados apresentam uma enorme similaridade com os achados na Síndrome de Laron sugerindo que o IGF-I circulante na vida

pós natal não é fundamental para a normal arquitetura da retina, pelo menos quando avaliada pela OCT.

Nosso trabalho tem algumas limitações. A primeira, a não uniformidade no número de indivíduos utilizados em todas as avaliações, devido ao fato de que para a vascularização retiniana, metade das retinografias não foram consideradas aptas para o *scoring*. Outra limitação foi o fato da utilização, por razões logísticas, de um sistema semiquantitativo para avaliar o número de ramificações vasculares e tamanho do disco óptico e da escavação. No entanto, este inconveniente foi atenuado por usar um sistema simples e robusto de categorização para estas variáveis, executado pela oftalmologista com maior experiência mundial nos processos quantitativos de avaliação das mesmas na DGH e síndromes de insensibilidade ao GH (HELLSTRÖM, A. S. *et al.*, 1999; HELLSTRÖM, A. *et al.*, 2002). Espera-se, com este trabalho, que este olhar ultra especializado possa ser útil na avaliação retiniana da DIGH por outros especialistas.

Nossos dados caracterizam um fenótipo retiniano distinto, porém benigno na DIGH devido a uma mutação inativadora no gene do receptor do GHRH.

7. CONCLUSÕES

Os indivíduos com DIGH devido à mutação c.57+1G>A no gene do GHRH-R apresentam, em reação aos controles:

Redução do número de ramificações dos vasos da retina

Maior disco óptico

Maior escavação do disco óptico

Similar espessura da mácula.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; GILL, M. S.; BARRETTO, E. S. A.; ALCÂNTA, M. R. S.; MIRAKI-MOUD, F.; MENEZES, C. A.; SOUZA, A. H. O.; MARTINELLI, C. E.; PEREIRA, F. A.; SALVATORI, R.; LEVINE, M. A.; SHALET, S. M.; CAMACHO-HUBNER, C.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Effect of severe growth hormone (GH) deficiency due to a mutation in the GH-releasing hormone receptor on insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, and ternary complex formation throughout life. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 4118-4125, 1999.

AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; OLIVEIRA, F. T.; PEREIRA, R. M. C.; OLIVEIRA, C. R. P.; BLACKFORD, A.; VALENÇA, E. H. O.; SANTOS, E. G.; GOIS-JUNIOR, M. B.; MENEGUZ-MORENO, R. A.; ARAUJO, V. P.; OLIVEIRA-NETO, L. A.; ALMEIDA, R. P.; SANTOS, M. A.; FARIAS, N. T.; SILVEIRA, D. C. R.; CABRAL, G. W.; CALAZANS, F. R.; SEABRA, J. D.; LOPES, T. F.; RODRIGUES, E. O.; PORTO, L. A.; OLIVEIRA, I. P.; MELO, E. V.; MARTARI, M.; SALVATORI, R. Longevity in Untreated Congenita Growth Hormone Deficiency Due to a Homozygous Mutation in the GHRH Receptor Gene. **The Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n.2, p.714-721, 2010.

AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; SALVATORI, R. Lifetime Growth Hormone (GH) Deficiency: Impact on Growth, Metabolism, Body Composition and Survival Capacity . In: **Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease**. Springer Science Business Media, LLC. Ed. Preedy, 2011. Chapter ID 160. SPB-192689.

ALCÂNTARA, M. R. S.; SALVATORI, R.; ALCÂNTARA, P. R. S.; NÓBREGA, L. M. A.; CAMPOS, V. S.; OLIVEIRA, E. C. O.; OLIVEIRA, M. H. S.; SOUZA, A. H. O.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Thyroid morphology and function in adults with untreated isolated growth hormone deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 3, p.860-864, 2006.

BARBOSA, J. A. R.; SALVATORI, R.; OLIVEIRA, C. R. P.; PEREIRA, R. M. C.; FARIA, C. T.; BRITTO, A. V. O.; FARIAS, N. T.; BLACKFORD, A.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Quality of life in congenital, untreated, lifetime, isolated growth hormone deficiency. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34 , n. 6, p. 894-900, 2009.

BARRETO-FILHO, J. A. S.; ALCÂNTARA, M. R. S.; SALVATORI, R.; BARRETO, M. A.; SOUSA, A. C. S.; BASTOS, V.; SOUSA, A. H. O.; PEREIRA, R. M. C.; CLAYTON, P. E.; GILL, M. S.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Familial isolated growth hormone deficiency is associated with increased systolic blood pressure, central obesity, and dyslipidemia. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.87, n.5, p. 2018-2023, 2002.

BAUDET, M. L.; HASSANALI, Z.; SAWICKI, G.; LIST, E. O.; KOPCHICK, J. J.; HARVEY, S. Growth hormone action in the neural retina: A proteomic analysis. **Proteomics**, v. 8, p. 389-401, 2008.

BOGUSZEWSKI, L. C.; **The heterogeneity of human growth hormone: novel isoforms, assay development and clinical implications.** 1997. 128 folhas. Tese de Doutorado. Research Centre of Endocrinology and Metabolism, Departament of Internal Medicine, Sahlgrenska University Hospital. Göteborg University. Göteborg, Sweden.

BOUCAULT, F. C.; MOURA, R., T.; MITRE, J.; REHDER, J. R. C. L. Análise da relação entre espessura macular e espessura da camada de fibras nervosas. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 70, n. 1, p. 23-26, 2011.

BOURLA, D. H.; WEINBERGER, D. Ocular findings in Laron Syndrome. In: LARON, Z.; KOPCHICK, J. J. **Laron Syndrome - From Man to Mouse.** London-New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. Ch. 21, p. 201-208.

COLLET-SOLBERG, P. F.; LIU, G. T.; SATIN-SMITH, M.; KATZ, L. L.; MOSHANG JR., T. Pseudopapilledema and congenital disc anomalies in growth hormone deficiency. **Journal of Pediatric Endocrinology**, v. 11, p. 261-265, 1998.

CUTHBERTSON, R. A.; BECK, F.; SENIOR, P. V.; HARALAMBIDIS, J.; PENSCHOW, J. D.; COGHLAN, J. P. Insulin-like growth factor II play a local role in the regulation of ocular size. **Development**, v. 107, p. 123-130, 1989.

DANIS, R. P.; BINQAMAN, D. P. Insulin-like growth factor-1 retinal microangiopathy in the pig eye. **Ophthalmology**, v. 104, n. 10, p. 1661-1669, 1997.

DAS, A.; MCGUIRE, P. G. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, p. 721-748, 2003.

EVANS, H. M.; LONG, J. A.; The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity and oestrus cycles of the rat. **Anatomical Record**, v.21, p. 62-63, 1922.

FERREIRA, T. V.; **Reprodutibilidade de leitura de retinografias digitais do ELSA Brasil**. 2012. 103 folhas. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia). Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS.

GLEESON, H. K.; SOUZA, A. H. O.; GILL, M. S.; WIERINGA, G. E.; BARRETTO, E. S.; BARRETO-FILHO, J. A.; SHALET, S. M.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; CLAYTON, P. E. Lipid profiles in untreated severe congenital isolated growth hormone deficiency through the lifespan. **Clinical Endocrinology**, v.57, n. 1, p. 89-95, 2002.

GUEVARA-AGUIRRE, J.; ROSENBLOM, A. L.; VACCARELLO, M. A.; FIELDER, P. J.; DE LA VEJA, A.; DIAMOND, F. B. JR.; ROSENFELD, R. G. Growth hormone receptor deficiency (Laron Syndrome): clinical and genetic characteristics. **Acta Paediatrica Scandinavica. Supplement**, v. 377, p. 96-103, 1991.

HARVEY, S.; JOHNSON, C. M. D.; SHARMA, P.; SANDERS, E. J.; HULL, K. L. Growth hormone: a paracrine growth factor in embryonic development? **Comparative biochemistry and physiology. Part C. Pharmacology, toxicology and endocrinology**, v. 119, n. 3, p. 305-315, 1998.

HARVEY, S.; KAKEBEEKE, M.; MURPHY, A. E.; SANDERS, E. J. Growth hormone in the nervous system: autocrine or paracrine roles in retinal function? **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 371-384, 2003.

HARVEY, S.; MARTIN, B. T.; BAUDET, M. L.; DAVIS, P.; SAUVE, Y.; SANDERS, E. J. Growth hormone in the visual system: Comparative endocrinology. **General and comparative Endocrinology**, v. 153, p. 124-131, 2007.

HARVEY, S.; PARKER, E.; MACDONALD, I.; SANDERS, E. J. Growth hormone is present in the human retina and vitreous fluid. **Neuroscience Letters**, v. 455, p. 199-202, 2009.

HELLSTRÖM, A.; CARLSSON, B.; NIKLASSON, A.; SEGNESTAM, K.; BOGUSZEWSKI, M.; LACERDA, L.; SAVAGE, M.; SVENSSON, E.; SMITH, L.; WEINBERGER, D.; WIKLAND, K. A.; LARON, Z. IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 7, p. 3413-3416, 2002.

HELLSTRÖM, A.; SVENSSON, E.; CARLSSON, B.; NIKLASSON, A.; ALBERTSSON-WIKLAND, K. Reduced retinal vascularization in children with growth hormone deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 2, p. 795-798, 1999.

HOUSSAY, B. A. Carbohydrate metabolism. **The New England Journal of Medicine**, v. 214, n. 20, p. 971-986, 1936.

HUANG, D.; SWANSON, E. A.; LIN, C. P.; SCHUMAN, J. S.; STINSON, W. G.; CHANG, W.; HEE, M. R.; FLOTTE, T.; GREGORY, K.; PULIAFITO, C. A.; FUJIMOTO, J. G. Optical coherence tomography. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1178-1181, 1991.

LARON, Z. Syndrome of familial dwarfism and high plasma immunoreactive growth hormone. **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1247-1253, 1974.

LI, C. H.; EVANS, H. M. Chemistry of anterior pituitary hormones. In: **The Hormones**. PINCUS, G.; THIERMAN, K. V. New York, Academic Press, 1948.

LOW, M. J. Neuroendocrinology. In: KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.; LARSEN, P.R. **Williams Textbook of Endocrinology**, Ed. 11, Philadelphia, Saunders Elsevier, 2008, Ch. 7.

MAHESHWARI, H. G.; SILVERMAN, B. L.; DUPUIS, J.; BAUMANN, G. Phenotype and genetic analysis of a syndrome caused by an inactivating mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor: dwarfism of Sindh. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 11, p. 4065-4074, 1998.

MARTINELLI JR., C. E.; CUSTÓDIO, R. J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia do eixo GH-sistema IGF. *Arquivos Brasileiros de endocrinologia e Metabologia*, v.52, n. 5, p. 717-725, 2008.

MELMED, S.; KLEINBERG, D. Anterior pituitary. In: KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.; LARSEN, P.R. **Williams Textbook of Endocrinology**, Ed. 11, Philadelphia, Saunders Elsevier, 2008, Ch. 8.

MENEZES, M.; SALVATORI, R.; OLIVEIRA, C. R. P.; PEREIRA, R. M. C.; SOUZA, A. H. O.; NOBREGA, L. M. A.; CRUZ, E. A. C.; MENEZES, M.; ALVES, E. O.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Climateric in untreated isolated growth hormone deficiency. **Menopause**, v. 15, n. 4, p. 743-747, 2008.

MOHNEY, B. G.; YOUNG, R. C.; DIEHL, N. Incidence and associated endocrine and neurologic abnormalities of optic nerve hypoplasia. **JAMA Ophthalmology**, v. 1331, n. 7, p. 898-902, 2013.

NALCACIOGLU-YUKSEKKAYA, P.; SEN, E.; YILMAZ, S.; ELGIN, U.; GUNAYDIN, S.; AYCAN, Z. Decreased retinal nerve fiber layer thickness in patients with congenital isolated growth hormone deficiency. **European Journal of Ophthalmology**, v. 24, n. 6, p. 873-878, 2014.

NETCHINE, I.; TALON, P.; DASTOT, F.; VITAUX, F.; GOOSSENS, M.; AMSELEM, S. Extensive phenotypic analysis of a family with growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 2, p. 432-436, 1998.

OATMAN, O. J.; MCCLELLAN, D. R.; OLSON, M. L.; GARCIA-FILION, P. Endocrine and pubertal disturbances in optic nerve hypoplasia, from infancy to adolescence. **International Journal of Pediatric Endocrinology**, n.8, 2015.

OLIVEIRA, C. R. P.; MENEGUZ-MORENO, R. A.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; BARRETO-FILHO, J. A. S. Emerging role of the GH/IGF-I on cardiometabolic control. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 97, n. 5, p. 434-439, 2011.

OLIVEIRA, C. R. P.; PEREIRA, R. M. C.; BARRETO-FILHO, J. A. S.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Consequências em longo prazo da deficiência do hormônio do crescimento. **Arquivos Brasileiros de endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 5, p. 745-749, 2008, b.

OLIVEIRA, C. R. P.; SALVATORI, R.; NOBREGA, L. M. A.; CARVALHO, E. O. M.; MENEZES, M.; FARIAS, C. T.; BRITTO, A. V. O.; PEREIRA, R. M. C.; AGUIAR-OLIVIERA, M. H. Sizes of abdominal organs in adults with severe short stature due to severe, untreated, congenital GH deficiency caused by a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. **Clinical Endocrinology (Oxf)**, v. 68, n. 1, p. 153-158, 2008.a

OLIVEIRA, J. L. M.; MARQUES-SANTOS, C.; BARRETO-FILHO, J. A.; XIMENES-FILHO, R.; BRITTO, A. V. O.; SOUZA, A. H. O.; PRADO, C. M.; OLIVEIRA, C. R. P.; PEREIRA, R. M. C.; VICENTE, T. A. R.; FARIAS, C. T.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; SALVATORI, R. Lack of Evidence of Premature Atherosclerosis in Untreated Severe Isolated Growth Hormone (GH) Deficiency due to a GH-Releasing Hormone Receptor Mutation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 6, p. 2093-2099, 2006.

OLIVEIRA-NETO, L. A.; MELO, M. F. B.; FRANCO, A. A.; OLIVEIRA, A. H. A.; SOUZA, A. H. O.; VALENÇA, E. H. O.; BRITTO, I. M. P. A.; SALVATORI, S.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Cephalometric features in isolated growth hormone deficiency. **The Angle Orthodontist**, v. 81, n. 4, p. 578-583, 2011.

OLIVEIRA, H. A.; SALVATORI, S.; KRAUSS, M. P. O.; OLIVEIRA, C. R. P.; SILVA, P. R. C.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Magnetic resonance imaging study of pituitary morphology in subjects homozygous and heterozygous for a null mutation of the GHRH receptor gene. **European Journal of Endocrinology**, v. 148, p. 427-432, 2003.

PAULA, A. Fundoscopia. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 75, n. 4, p. 36-38, 42, 48 passim, 1998.

PAULA, F. J. A.; GOIS JR., M. B.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; PEREIRA, F. A.; OLIVEIRA, C. R. P.; PEREIRA, R. M. C.; FARIAS, C. T.; VICENTE, T. A. R.; SALVATORI, R. Consequences of lifetime isolated growth hormone (GH) deficiency and effects of short-term GH treatment on bone in adults with a mutation in the GHRH-receptor gene. **Clinical Endocrinology** (Oxf), v. 70, n. 1, p. 35-40, 2009.

POULSEN, J. E. Recovery from Retinopathy in a Case of Diabetes With Simmond's Disease. **Diabetes**, v. 2, n. 1, p. 7-12, 1953.

PRADO-BARRETO, V. M.; SALVATORI, S.; JUNIOR, R. C. S.; BRANDÃO-MARTINS, M. B.; CORREA, E. A.; GARCEZ, F. B.; VALENÇA, E. H. O.; SOUZA, A. H. O.; PEREIRA, R. M. C.; NUNES, M. A. P.; D'AVILA, J. S.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Hearing Status in Adult Individuals with Lifetime, Untreated Isolated Growth Hormone Deficiency. **Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 150, n. 3, p. 464-471, 2014.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Olho. In: **Histologia Texto e Atlas. Em correlação com biologia celular e molecular**. Eds.ROSS, M. H.; PAWLINA, W. [revisão técnica Almeida, J. M. ; tradução Paulo, A.F.D.].- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, ch.24.

ROTH, A. M. Retinal vascular development in premature infants. **American Journal of Ophthalmology**, v. 84, n. 5, p. 636-640, 1977.

RYMASZEWSKI, Z.; COHEN, R. M.; CHOMCZYNSKI, P. Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, n. 2, p.617-621, 1991.

SAKATA, L. M.; DeLEON-ORTEGA, J.; SAKATA, V.; GIRKIN, C. Optical coherence tomography of retina and optic nerve - a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 37, p. 90-99, 2009.

SALVATORI, R.; FAN, X.; PHILLIPS III, J. A.; ESPIGARES-MARTIN, R.; MARTIN DE LARA, I.; FREEMAN, K. L.; PLOTNICK, L.; AL-ASHWAL, A.; LEVINE, M. Three new mutations in the gene for growth hormone (GH)- releasing hormone receptor in familial isolated GH deficiency type IB. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 273-279, 2001.

SALVATORI, R.; HAYASHIDA, C. Y.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H.; PHILLIPS III, J. A.; SOUZA, A. H. O.; GONDO, R. G.; TOLEDO, S. P. A.; CONCEIÇÃO, M. M.; PRINCE, M.; MAHESHWARI, H. G.; BAUMANN, G.; LEVINE, M. A. Familial dwarfism due to a novel mutation of the growth hormone-releasing hormone receptor gene. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 917-923, 1999.

SOUZA, A. H. O.; SALVATORI, R.; MARTINELLI JR., C. E.; CARVALHO, W. M. O.; MENEZES, C. A.; BARRETTO, E. S. A.; BARRETO-FILHO, J. A. S.; ALCÂNTARA, M. R. S.; OLIVEIRA, C. R. P.; ALCÂNTARA, P. R. S.; RAMALHO, R. J. R.; OLIVEIRA, H. A.; LIMA, I. B.; CARNEIRO, J. N.; SANTOS, M. M.; GILL, M. S.; CLAYTON, P. E.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Hormônio do crescimento ou somatotrófico: novas perspectivas na deficiência isolada de GH a partir da descrição da mutação no gene do receptor de GHRH nos indivíduos da cidade de Itabaianinha, Brasil, **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 3, p. 406-413, 2004.

SPIEGEL, A.; CARTER-SU, C.; TAYLOR, S. I. Mechanism of action of hormones that act at the cell surface. In: KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.; LARSEN, P.R. **Williams Textbook of Endocrinology**, Ed. 11, Philadelphia , Saunders Elsevier, 2008, Ch. 5.

VALENÇA, E. H. O.; SALVATORI, R.; SOUSA, A. H. O.; OLIVEIRA-NETO, L. A.; OLIVEIRA, A. H. O.; GONÇALVES, M. I. R.; OLIVEIRA, C. R. P.; D'AVILA, J. S.; MELO, V. A.; CARVALHO, S.; ANDRADE, B. M. R.; NASCIMENTO, L. S.; ROCHA, S. B. V.; RIBEIRO, T. R.; PRADO-BARRETO, V. M.; MELO, E. V.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Voice formants in individuals with congenital, isolated, lifetime growth hormone deficiency. **Journal of Voice**, p. 1-6, 2015.

VALENÇA, E. H. O.; SOUSA, A. H. O.; OLIVEIRA, A. H. A.; VALENÇA, S. L.; SALVATORI, R.; GONÇALVES, M. I. R.; OLIVEIRA-NETO, L. A.; BARROS, A. D.; NASCIMENTO, U. N.; OLIVEIRA, C. R. P.; CARDOSO, D. F.; MELO, V. A.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Voice quality in short stature with and without GH deficiency. **Journal of Voice**, v. 26, n. 5, p. 673.e-13-673.e-19, 2012.

VIMPANI, G. V.; VIMPANI, A. F.; LIDGARD, G. P.; CAMERON, E. H. D.; FARQUHAR, J. W. Prevalence of severe growth hormone deficiency. **British Medical Journal**, v. 2, p. 427-430, 1977.

WAJNRAJCH, M. P.; GERTNER, J. M.; HARBISON, M. D.; CHUA, S. C. JR.; LEIBEL, R. L. Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. **Nature Genetics**, v. 12, n. 1, p. 88-90, 1996.

WILSON, S. H.; DAVIS, M. I.; CABALLERO, S.; GRANT, M. B. Modulation of retinal endothelial cell behavior by insulin-like growth factor I and somatostatin analogues: implications for diabetic retinopathy. **Growth Hormone & IGF Research, Supplement A**, S53-S59, 2001.

WRIGHT, A. D.; KOHNER, E. M.; OAKLEY, N. W.; HARTOG, M.; JOPLIN, G. F.; RUSSEL-FRASER, T. Serum growth hormone levels and the response of diabetic retinopathy to pituitary ablation. **British Medical Journal**, v. 2, p. 346-348, 1969.

APÊNDICE A - Artigo

Abnormal vascular and neural retinal morphology in congenital lifetime isolated growth hormone deficiency

Virginia M. Pereira-Gurgel¹, Augusto C. N. Faro², Roberto Salvatori³, Thiago A. Chagas², José F. Carvalho-Junior², Carla R. P. Oliveira¹, Ursula M.M. Costa¹, Ann Hellström⁴ and Manuel H. Aguiar-Oliveira¹

¹ Division of Endocrinology, ²Division of Ophthalmology Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil 49060–100; ³Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, The Johns Hopkins University School of Medicine Baltimore, Maryland 21287 USA; ⁴Sahlgrenska Academy, The Queen Silvia Children's Hospital, Goteborg, Sweden

Corresponding author:

Roberto Salvatori, MD,
Division of Endocrinology,
Johns Hopkins University School of Medicine,
1830 East Monument street suite #333,
Baltimore, MD 21287
Tel. (410) 955-3921
Fax (410) 367-2042
E-mail: salvator@jhmi.edu

Disclosure statement: R.S. serves in the advisory board of Novo Nordisk, Novartis and Pfizer, A.H. works as a medical consultant for Shire and own shares in Premalux Limited Kettering, United Kingdom.

Word count: 1670

Abstract

Context and objectives: Experimental models demonstrate an important role of growth hormone (GH) in retinal development. However, the interactions between GH and the neuro-vascularization of the human retina are still not clear, with one clinical study showing reduced retinal vascularization in human GH deficiency (GHD). A model of untreated congenital isolated GH deficiency (IGHD) may clarify the action of GH on the retina. The purpose of this work was to assess the retinal neuro-vascularization in congenital IGHD.

Methods: In a cross sectional study, we performed fundus photographs (to assess the number of retinal vascular branching points and the optic disc and cup size), and optical coherence tomography (to assess the thickness of macula) in 23 adult IGHD subjects homozygous for a *null* mutation (c.57+1 G>A) in the GH releasing hormone receptor gene and 22 controls.

Results: Fisher's exact test revealed that IGHD subjects presented more reduction of vascular branching points in comparison to controls, $p=0.049$. Conversely, the percentage of moderate reduction in IGHD was higher than in control ($p=0.01$). The rates of individuals with increased optic disc and cup size were increased in IGHD in comparison to controls ($p<0.0001$ in both cases). There was no difference in fovea thickness or in any of the macula layers.

Conclusions: Most IGHD individuals present moderate reduction of vascular branching points, increase of optic disc and cup size, but normal thickness of the macula.

Key Words: Isolated GH deficiency, GH, IGF-I, Retina, Retinal neovascularization

Introduction

The visual system is fundamental for the neuro-motor development, environmental adaptation, and survival capacity. Visual acuity depends on the eyes function and from the visual system's ability to process the images deriving from the retina. Body size is heavily influenced by the effect of circulating growth hormone (GH) and its main effector, the insulin-like growth factor type I (IGF-I) on bone and cartilage tissues. Conversely, it has been proposed that retinal development may reflect autocrine or paracrine ocular production of GH, IGF-I, IGF type II (IGF-II) and other peptides like fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) (1-5). Accordingly, in mice, rats and chickens GH and GH receptor gene expression was documented in the developing neural retina (3).

Although more than half a century has passed since the first description of regression of neovascularization in diabetic retinopathy after pituitary infarction and GH deficiency (GHD)(6), the interaction between GH/IGFs and vascularization of the human retina is still not completely understood (5). This description introduced hypophysectomy as a therapy for proliferative diabetic retinopathy. More recently, reduced retinal vascularization was shown in GHD children (7) and in GH insensitive (GHI) syndrome (Laron dwarfism) (8), suggesting that the GH-IGF-I axis is critical for normal vascularization of the human retina. Nevertheless, there was some overlapping between patients and controls in the two previous studies, suggesting that other factors may affect the pattern of vascularization. The consequences of congenital GHD or GHI in human retina may not be identical. While both models cause very low serum IGF-I levels, in the first there is often some GH secretion, albeit low, whereas the action of GH is completely impaired in GHI. Furthermore, congenital GHD can be isolated or associated to other pituitary deficits, and caused by several genetics or embryological insults, with direct consequences to the visual system (9,10). Therefore, it is important to assess if individuals with

inherited (therefore not caused by intrauterine insults) isolated GHD (IGHD) exhibit abnormalities in retinal neuro-vascularization. However, IGHD is a rare disease occurring in 1:3,480 to 1:10,000 live births (11), and most cases are treated with GH replacement during childhood. We have described in rural Northeastern Brazil a cohort of IGHD individuals due to a homozygous mutation (c.57 +1 G>A) in the GH releasing hormone receptor (GHRHR) gene (*GHRHR*). Despite severe short stature with adult height ranging from 107 to 137 cm in pooled genders (12), these IGHD individuals cope well with daily challenges, do not exhibit neurodevelopment problems, and have normal life expectancy (13). Therefore, we hypothesized that these individuals present satisfactory retinal health, contributing to their normal survival. The objective of this study is to assess retinal neuro-vascularization in these untreated IGHD individuals.

Subjects and Methods

Subjects

In a cross-sectional study, adult GH-naïve IGHD subjects and age and sex-matched controls were recruited by advertising in the local Dwarfs Association, and by word of mouth among the inhabitants of Itabaianinha County. Inclusion criterium for IGHD was genotype-proven homozygosity for the C.57+1G>A *GHRHR* mutation, whereas for controls was proven homozygosity for the wild-type *GHRHR* allele. Exclusion criteria for both groups were previous GH replacement, the presence of other genetic and acquired diseases that could alter the eye fundus appearance, diabetes with hemoglobin A1c more than 8 %, and hypertension requiring more than four drugs. Twenty-three IGHD, with height of 1.25 (0.10) m, 11 women, 44.2 (14.1) years (range 25-75) and 22 controls, with height of 1.63(0.1) m, 9 women, 49.4(12.3) years (range 26-72) volunteered. The Federal University of Sergipe Institutional Review Board approved these studies, and all subjects gave written informed consent.

Study protocol

The individuals had a complete eye examination including fundus photography (Visucam 500, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) and optical coherence tomography (OCT), (Stratus 3000, Carl Zeiss Meditec Inc. Dublin, CA.USA), after cycloplegia. All fundus photographs were digitally recorded, sent to Goteborg, Sweden, and analyzed by the same examiner (A.H.) blinded to the GH status.

Fundus photograph

Branching point reduction was assessed in well-focused photographs in 11 IGHD individuals and 17 controls. Both eyes were examined and there was no discrepancy between eyes regarding vascular branching points. The examiner classified in a blind fashion the

branching point reduction in the initial categories: no reduction, mild reduction, moderate reduction and severe reduction. As no IGHD had no reduction, and no control had mild reduction, we pooled no reduction and mild reduction in the final classification as minimal reduction. The same examiner in 14 IGHD individuals and 28 controls (one control has only the optic disc assessment) evaluated the optic disc size (normal, decreased, or increased) and cup size (normal or increased).

OCT

Twenty-five IGHD and 22 controls subjects were analyzed and the average of each right and left macular regions were calculated, before comparison. Two IGHD subjects had only one eye analyzed, as the remaining eyes were excluded, one due to toxoplasmosis and another because of retinal detachment. The same occurred with one control subject due to severe cataract. We measured the thickness of the fovea and of eight macula regions: inner superior, inner inferior, inner nasal, inner temporal, outer superior, outer inferior, outer nasal, and outer temporal.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean (standard deviation). Categorical variables were expressed in absolute number and percentage. The Student t test was used to compare continuous variables. Fisher's exact test was used to compare the categorical variables. Statistical analysis was performed using the statistical software IBM®SPSS® Version 20. Probability values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Table 1 shows the vascular branching point reduction in IGHD subjects and controls in absolute number (n) and percentage (%) in the initial categories. Figure 1 show the final classification of the rate of vascular branching point reduction. Fisher's exact test revealed that IGHD subjects presented more reduction of vascular branching points in comparison to controls, $p=0.049$. Conversely, the percentage of moderate reduction in IGHD was higher than in control (91% vs. 53%, $p=0.01$). Figures 2 and 3 show that the rates of individuals with increased optic disc and cup size were increased in IGHD in comparison to controls ($p<0.0001$ in both cases). Table 2 shows that there was no difference in the thickness of the fovea, or of any of the macula layers.

Discussion

This work describes three principal ocular findings in adults with lifetime, untreated, inherited IGHD. First, a moderate reduction of vascular branching points; second, a mild increase in the optic disc and cup size; and third normal thickness of the macula.

Only one paper has previously reported the retinal vascularization status in 39 children (aged 3.6-18.7 years old) with congenital GHD(six with multiple pituitary deficiencies), most without genetic testing and already on GH treatment(7). Another study looked at 11 individuals with GHI aged 10 to 40 years(8). In both studies, a reduction of vascular branching points was found, apparently more marked in GHI. Since IGF-I deficiency is common to both conditions, this factor has been hypothesized to be critical for the normal vascularization of the human retina. Our IGHD data seem agree with those findings, although the magnitude of reduction was predominantly moderate. This finding suggests possible compensatory mechanism(s) in IGHD due to *GHRHR* mutation. As the retinal vascularization normally occurs during fetal development (14), it can be influenced more by the insulin growth factor type II (IGF-II), thought to be more relevant for fetal somatic and ocular development (1) than IGF-I. Interestingly, the Itabaianinha IGHD individuals exhibit an up regulation of serum IGF-II (15) which could influence the retina vessels partially counteracting the consequences of GHD and IGF-I reduction.. The more marked reduction of vascular branching points in GHI can reflect a lack of an additive direct angiogenic GH effect on the retinal vessels. Together, our and previous findings show a reduction of vascular branching points in IGHD, with a slow progression to advanced stages of vascular branching points reduction.

The second finding of this work is the simultaneous increase of the optic disc and cup size, probably with less affected rim area (the area between the cup and the border of optic disc), indicating preservation of enough retinal ganglion cell number (RGC). RGC survival is strongly dependent from ocular GH, as both GH and GH receptors were demonstrated in these

cells (17). Conversely, pituitary GH and circulating IGF-I are not critical to birth weight, as IGHD babies due to *GHRHR* mutations are born with normal size (12). It was suggested that the GH and GH receptor activity in the early embryonic retina and the effect on RGC development might explain the decreased peripapillary nerve fiber thickness in some children with congenital GHD (17), not assessed in our study. An increase in optic disc is generally considered a marker of abnormal neurodevelopment. Normal (17), reduced or increased optic disc size were previously described in GHD (18), possibly reflecting the variety of causes of GHD. While optic nerve hypoplasia is often linked to septo-optic dysplasia (9), it was suggested that an increased optic disc could predict the possibility of GHD in a child with severe short stature (18). Our findings seem to corroborate this hypothesis. Therefore, an increased optic disc size, similar to voice (19) and cephalometric findings (20) can facilitate diagnosis of congenital IGHD.

The third finding of this work is the normal thickness of the macula assessed by OCT, a technique that provides detailed information of cross sectional retinal anatomy and quantification of retinal morphology (21-22). There is no previous published data about OCT in congenital IGHD. However OCT data in Laron dwarfism (GHI syndrome) also show normal thickness of the all the macula regions and normal retina architecture (23). Together with GHI findings, our data suggest that postnatal circulating IGF-I is not critical for the macula architecture, at least as assessed by OCT.

In conclusion, adult with congenital, lifetime, isolated IGHD present a moderate reduction of vascular branching points, an increase of optic disc, with normal thickness of the macula. These data feature a distinct, but benign retinal phenotype in congenital IGHD due to an inactivating *GHRHR* mutation.

Funding:

This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sector.

Acknowledgments

The authors thank the *Associação do Crescimento Físico e Humano de Itabaianinha* and *Hospital Ocular in Aracaju, Sergipe* for assistance.

References

1. Cuthbertson RA, Beck F, Senior PV, Haralambidis J, Penshchow JD & Coghlan JP. Insulin-like growth factor II may play a local role in the regulation of ocular size. *Development* 1989 **107** 123-130.
2. Harvey S, Martin BT, Baudet ML, Davis P, Sauve Yves & Sanders EJ. Growth hormone in the visual system: Comparative endocrinology. *General and Comparative Endocrinology* 2007 **153** 124-131.
3. Baudet ML, Hassanali Z, Sawicki G, List EO. Growth hormone action in the developing neural retina: A proteomic analysis. *Proteomics* 2008 **8** 389-401.
4. Harvey S, Parker E. Growth hormone is present in the human retina and vitreous fluid. *Neuroscience Letters* 2009 **455** 199-202.
5. Das A, McGuire P. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Progress in Retinal and Eye Research* 2003 **22** 721-748.
6. Poulsen, J. E. Recovery from Retinopathy in a Case of Diabetes With Simmond's Disease. *Diabetes* 1953 **2** 7-12.
7. Hellström A, Svensson E, Carlsson B, Niklasson A & Albertsson-Wikland K. Reduced Retinal Vascularization in Children with Growth Hormone Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 **84** 795-798.
8. Hellström A, Carlsson B, Niklasson A, Segnestam K, Boguszewski M, Lacerda L, Savage M, Svensson E, Smith L, Weinberger D, Albertsson-Wikland K & Laron Z. IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 3413-3416.

9. Mohnney BG, Young RC&Diehl N. Incidence and Associated Endocrine and Neurologic Abnormalities of Optic Nerve Hypoplasia. *JAMA Ophthalmology* 2013 **131** 898-902.
10. Oatman OJ, McCellan DR, Olson ML & Garcia-Filion P. Endocrine and pubertal disturbances in optic nerve hypoplasia, from infancy to adolescence. *International Journal of Pediatric Endocrinology* 2015 **8**.
11. Vimpani GV, Vimpani AF, Lidgard GP, Cameron EH & Farquhar JW. Prevalence of severe growth hormone deficiency. *British Medical Journal* 1977 **2** 427-430.
12. Aguiar-Oliveira MH & Salvatori R. Lifetime Growth Hormone (GH) Deficiency: Impact on Growth, Metabolism, Body Composition and Survival Capacity . *Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease*.2011 V.R. Preedy.
13. Aguiar-Oliveira MH, Oliveira FT, Pereira RMC, Oliveira CRP, Blackford A, Valença EHO, Gomes-Santos E, Gois-Junior MB, Meneguz-Moreno RA, Araujo VP, Oliveira-Neto LA, Almeida RP, Santos MA, Farias NT, Silveira DCR, Cabral GW, Calazans FR, Seabra JD, Lopes TF, Rodrigues EO, Porto LA, Oliveira IP, Melo EV, Martari M & Salvatori R. Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *Journal of Endocrinology and Metabolism*2010**95**714-721.
14. Roth AM. Retinal vascular development in premature infants. *American Journal of Ophthalmology* 1977**84** 636-640.
15. Aguiar-Oliveira MH, Gill MS, Barretto ESA, Alcântara MRS, Miraki-Moud F, Menezes CA, Souza AHO, Martinelli CE, Pereira FA, Salvatori R, Levine MA, Shalet SM, Camacho-Hubner C & Clayton PE. Effect of severe growth hormone (GH) deficiency due to a mutation in the GH-Releasing Hormone Receptor on Insulin-like Growth Factors

- (IGFs), IGF-Binding Proteins, and ternary complex formation throughout life. *The Journal of Endocrinology & Metabolism* 1999 **84** 4118-4126.
16. Sanders EJ, Parker E, Harvey S. Endogenous growth hormone in human retinal ganglion cells correlates with cell survival. *Molecular Vision* 2009 **15** 920-926.
 17. Nalcacioglu-Yuksekkaya P, Sen E, Yilmaz S, Elgin U & Gunaydin S. Decreased retinal nerve fiber layer thickness in patients with congenital isolated growth hormone deficiency. *European Journal of Ophthalmology* 2014 **6** 873-878.
 18. Collette-Solberg PF, Liu GT, Satin-Smith M, Katz LL & Moshang Jr. T. Pseudo papilledema and congenital disc anomalies in growth hormone deficiency. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 1998 **11** 261-265.
 19. Valença EHO, Souza AHO, Oliveira AHA, Valença SL, Salvatori R, Gonçalves MIR, Oliveira-Neto LA, Barros AD, Nascimento UN, Oliveira CRP, Cardoso DF, Melo VA & Aguiar-Oliveira MH. Voice quality in short stature with and without GH deficiency. *Journal of Voice* 2012 **5** 673e13-673e19.
 20. Oliveira-Neto LA, Melo MFB, Franco AA, Oliveira AHA, Souza AHO, Valença EHO, Britto IMPA, Salvatori R & Aguiar-Oliveira MH. Cephalometric features in isolated growth hormone deficiency. *The Angle Orthodontist* 2011 **81** 578-583.
 21. Sakata LM, DeLeon-Ortega J, Sakata V, Girkin CA. Optical coherence tomography of the retina and optic nerve-a review. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2009 **37** 90-99.
 22. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA & Fujimoto JG. Optical Coherence Tomography. *Science* 1991 **254** 1178-1181.

23. Bourla DH & Weinberger D. Ocular Findings in Laron Syndrome. In *Laron Syndrome from Man to Mouse: Lessons from Clinical Experience*, ch. 21, pp 201-208. Eds. Zvi Laron & John J Kopchick. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.

Figure legends

Figure 1: Vascular branching point reduction rate in IGHD and Controls

Figure 2: Rate of optic disc size in IGHD and Controls

Figure 3: Rate of cup size in IGHD and Controls

Table 1: Branching point reduction in 11 IGHD individuals and 17 controls in absolute number (n) and percentage (%)

	Non	Mild	Moderate	Total
IGHD	0/0	1 (9.1%)	10 (90.9%)	11
Control	8 (47%)	0 (0%)	9 (53%)	17

Fisher's exact test revealed that IGHD subjects presented reduction of vascular branching points in comparison to controls ($p=0.0491$). The percentage of moderate reduction in IGHD was higher than in control ($p=0.01$).

Table 2. Macula OCT map thickness (microns) in 25 IGHD and 22 control subjects. Data are expressed in mean (standard deviation)

	IGHD	Control	p
Fovea	197.1 (34.8)	197.3 (23.2)	0.983
Inner Temporal	253.0 (29.6)	252.9 (21.3)	0.990
Inner Superior	266.1 (34.8)	268.3 (18.8)	0.786
Inner Nasal	267.7 (36.0)	268.0 (19.7)	0.968
Inner Inferior	269.3 (35.5)	260.7 (21.5)	0.760
Outer Temporal	219.2 (20.9)	220.8 (17.7)	0.777
Outer Superior	233.4 (23.6)	235.9 (17.3)	0.672
Outer Nasal	255.1 (26.7)	253.5(26.0)	0.832
Outer Inferior	235,2 (20.4)	232.9(18.4)	0.683

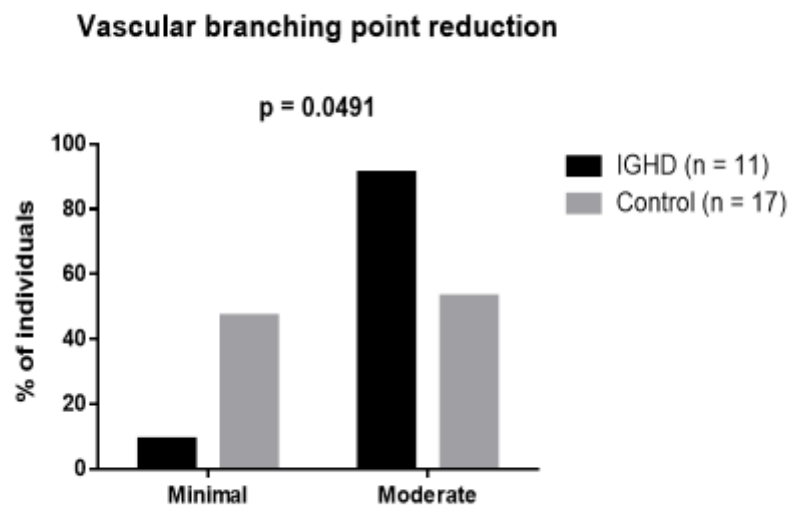


FIGURE 1

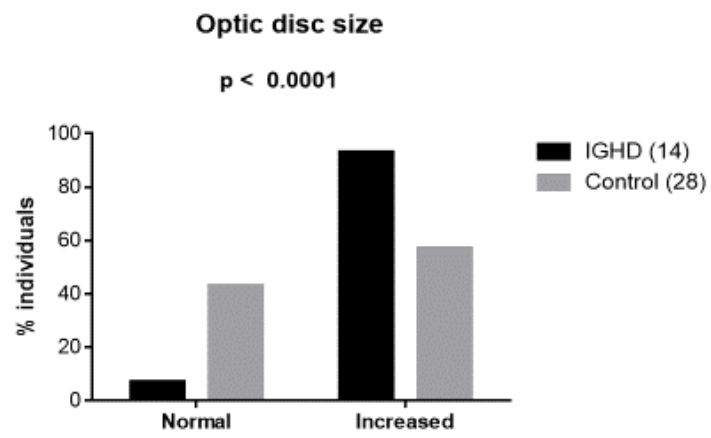


FIGURE 2

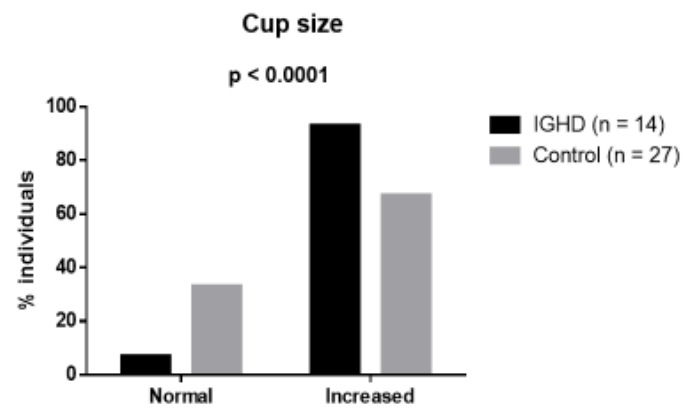


FIGURE 3

ANEXO A

Submissão do Artigo ao European Journal of Endocrinology em 14 de março de 2016

14-Mar-2016

Dear Dr. Salvatori,

Your manuscript entitled 'Abnormal vascular and neural retinal morphology in congenital lifetime isolated growth hormone deficiency' has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the European Journal of Endocrinology.

Your manuscript ID is EJE-16-0230

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/eurjendocrinol> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/eurjendocrinol>.

Manuscript submissions are screened against the CrossCheck database to check for originality.

Please be aware that research articles over 6 printed pages in length, and review articles over 10 pages, will incur page charges - for further details please visit <http://www.eje-online.org/site/misc/Charges.xhtml>

We offer Open Access, please check our policy pages http://www.eje-online.org/site/misc/Bioscientifica_Open_Access_Policy.xhtml. It is the authors' responsibility to check if their funder mandates Open Access.

All co-authors are copied into this email to ensure they are aware that the submission has been made. It will be assumed that submitted manuscripts carry the approval of all the authors. Should you have any queries regarding this please contact the Editorial Office.

Thank you for submitting your manuscript to the European Journal of Endocrinology.

Yours sincerely,
European Journal of Endocrinology Editorial Office

Bioscientifica Ltd
Reg. in England no. 3190519

Euro House
22 Apex Court
Woodlands, Bradley Stoke
Bristol BS32 4JT
United Kingdom

ANEXO B – Aprovação do projeto




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
CAMPUS DA SAÚDE PROF. JOÃO CARDOSO NASCIMENTO JR
 Rua Cláudio Batista S/N- Centro de Pesquisas Biomédicas - Bairro Sanatório
 CEP: 49060-100 Aracaju -SE / Fone:(79) 2105-1805
 E-mail: ccphu@ufs.br

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Protocolo de Pesquisa intitulado: “**AValiação OFTALMOLÓGICA NOS INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA ISOLADA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM ITABAIANINHA - SE**” – Nº CAAE – 0112.0.107.000-11, sob orientação do pesquisador **Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe- CEP/UFS em reunião realizada dia 06/05/2011.

Cabe ao pesquisador apresentar ao CEP/UFS os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Res. CNS 196/96).

Aracaju, 10 de maio de 2011.


 Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira
 Coordenador do CEP/UFS

